UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN STÄRKE-METABOLISMUS BEI PSEUDOMONAS STUTZERI

DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

am Fachbereich Biologie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

JÜRGEN SCHMIDT

aus Lübeck-Travemünde

1977

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN STÄRKE-METABOLISMUS BEI PSEUDOMONAS STUTZERI

DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

am Fachbereich Biologie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

JÜRGEN SCHMIDT

aus Lübeck-Travemünde

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent : Prof. Dr. E.-R. Lochmann

2. Referent : Prof. Dr. G. Bärwald

Tag der mündlichen Prüfung : 22. November 1977

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

MEINEN ELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549607_0015

	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	4
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	6
2.	EXPERIMENTELLES	
2.1.	Material	9
2.1.1.	Mikroorganismen	9
2.1.2.	Chemikalien und Reagenzien	9
2.1.3.	Herstellung von Maltotetraose	11
2.1.4.	Herstellung von Maltodextrinen	12
2.1.5.	Reinigung von Amylomaltase aus E.coli ML30	13
2.2.	Methoden	15
2.2.1.	Kultivierung von Ps. stutzeri im Fermenter	15
2.2.2.	Bestimmung der Amylase-Aktivität	16
2.2.3.	Bestimmung der Maltodextrin-Phosphorylase-Aktivität	17
2.2.4.	Bestimmung der Transferase-Aktivität	17
2.2.5.	Proteinbestimmung	17
2.2.6.	Konzentrierung der Proteinlösungen	18
2.2.7.	Bestimmung der reduzierenden Zucker	18
2.2.8.	Chromatographie der Kohlenhydrate an Bio-Gel P-2	18
2.2.9.	Reinigung der Amylase aus Ps.stutzeri	19
-	Konzentrierung der extrazellulären Amylase	19
-	Affinitätschromatographie	19
-	Chromatographie an Hydroxylapatit	20
2.2.10.	Methoden zur Charakterisierung der Amylase aus Ps.stutzeri	21
-	Diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese	21
-	Nachweis der Amylase-Aktivität im Gel	22
-	Bestimmung des Molekulargewichts der Amylase mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	22
-	Quervernetzung von Proteinen mit Dimethylsuberimidat und anschliessender SDS-PAGE	23
-	Chromatographie der Amylase an Sepharose 6B-CL in Gegenwart von 6M Guanidinhydrochlorid	24

-	Enzymatische Versuche	25
-	Kinetische Messungen	26
-	Abbau von Pullulan durch Amylase	27
-	Induktion der Amylasebildung durch Kohlenhydrate verschiedener Molekülgrösse	27
2.2.11.	Reinigung der Transferasen aus Ps. stutzeri	28
-	Herstellung zellfreier Extrakte und Ammoniumsulfatfällung	28
-	Chromatographie der Transferasen aus Ps.stutzeri an Sepharose 6B	28
-	Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-50	29
-	Chromatographie der Transferasen an Bio-Gel P-150	29
-	Chromatographie der Fraktion A und B an Hydroxylapatit	30
2.2.12.	Methoden zur Charakterisierung der gereinigten Transferasen aus Ps.stutzeri	30
-	Bestimmung des Molekulargewichts der Transferasen mit der diskontinuierlichen SDS-PAGE	30
-	Molekulargewichtsbestimmung durch Chromatographie an Sephadex G-200	31
-	Inkubation der Transferasen mit Maltodextrinen	31
-	Kinetische Messungen	32
-	Nachweis der α-1,4-glykosidischen Bindungen	33
-	Induktion der Transferasen mit Maltose und Maltotetraose	34
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	
3.1.	Induktion der Amylase durch verschiedene Kohlenhydrate	35
3.2.	Reinigung der Amylase	36
3.3.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	40
3.4.	Chromatographie an Sepharose 6B-CL in Gegenwart von 6M Gu·HCl	45
3.5.	Abbau von Stärke durch die Amylase	47
3.6.	Pullulanolyse durch Amylasen	49
3.7.	Kinetische Messungen	54

3.8.	Einfluss von EDTA und Calcium auf die Amylase-Aktivität	59
3.9.	Einfluss von Schwermetallionen und Thiol-Reagenzien auf die Amylase-Aktivität	60
3.10.	Induktion der Transferasen	61
3.11.	Reinigung der Transferasen	64
3.12.	Molekulargewichtsbestimmung an Sephadex G-200	69
3.13.	SDS - Gel - Elektrophorese	71
3.14.	Spezifität und Eigenschaften der Amylomaltase aus Ps. stutzeri	72
3.14.1.	Einfluss von pH und Temperatur auf die Aktivität der Amylomaltase	72
3.14.2.	Enzymatische Synthese von Maltodextrinen	74
3.14.3.	Nachweis von α-1,4-glykosidischen Bindungen	78
3.14.4.	Kinetische Messungen	79
3.14.5.	Einfluss von Metallionen, Kohlenhydraten und Thiol-Reagenzien auf die Aktivität der Amylomaltase	81
3.15.	Spezifität und Eigenschaften des D-Enzyms aus Ps. stutzeri	83
3.15.1.	Einfluss von pH und Temperatur auf die Aktivität des D-Enzyms	83
3.15.2.	Synthese von Maltodextrinen durch das D-Enzym	84
3.15.3.	Nachweis von α-1,4-glykosidischen Bindungen	89
3.15.4.	Kinetische Messungen	90
3.15.5.	Einfluss von Metallionen, Kohlenhydraten und Thiol-Reagenzien	91
3.16.	Die Verwertung von Stärke durch Ps. stutzeri	93
4.	ZUSAMMENFASSUNG	95
5.	LITERATUR	98

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

D-Enzym	-	Disproportionating Enzyme (E.C. 2.4.1.25)
G1, G2, G3, etc.	-	Glucose, Maltose, Maltotriose etc.
Gn	-	höhere Dextrine
B 4	-	verzweigtes (branched) Tetrasaccharid
B 5	-	verzweigtes (branched) Pentasaccharid
V_o	-	äusseres Volumen (= outer volume)
V_e	-	Elutionsvolumen
V_i	-	inneres Volumen
K_d	-	Verteilungskoeffizient
M.G.	-	Molekulargewicht
DEAE -	-	Diäthylaminoäthyl -
HA - Chromatographie	-	Hydroxylapatit-Chromatographie
SDS - PAGE	-	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PHADEBAS ®	-	Pharmacia Determination of Biological Active Substances
DNSS	-	3,5 - Dinitrosalicylsäure
C-Quelle	-	Kohlenstoff-Quelle
YET - Medium	-	Yeast-Extract-Trypton-Medium
NaP	-	Natriumphosphat
Tris	-	Tris (hydroxy methyl) - aminomethan
Gu • HCl	-	Guanidinhydrochlorid

EDTA	-	Äthylendiamintetraessigsäure
Bis	-	N, N' - Methylenbisacrylamid
TEMED	-	N, N, N', N' - Tetramethyläthylendiamin
pCMB	-	para - Chlormercuribenzoat
DTT	-	1,4 - Dithiotreit
BSA	-	Rinderserumalbumin
DNP - Alanin	-	2,4 - Dinitrophenylalanin
TCA	-	Trichloressigsäure

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Pseudomonaden sind auf Grund ihrer Anspruchslosigkeit im Boden, Wasser und in der Luft weit verbreitete Bakterien. Die Gattung Pseudomonas wurde von DOUDOROFF, STANIER und PALLERONI in grundlegenden Arbeiten eingehend untersucht (1 - 3). Die Autoren stellten dabei fest, dass von der Gattung Pseudomonas nur wenige Stämme in der Lage sind, Stärke abzubauen. Neben Pseudomonas pseudomallei (3), Pseudomonas saccharophila (1) und Pseudomonas amyloderamosa (4, 5) besitzt das Bakterium Pseudomonas stutzeri (2, 3) Amylasen zum Stärkeabbau.

Das Wirkungsmuster der extrazellulären Amylase aus Pseudomonas stutzeri (E.C. 3.2.1.60) wurde von ROBYT und ACKERMAN beschrieben (6). Die gereinigte Amylase bildet durch einen Exo-Mechanismus aus Stärke und Amylopektin Maltotetraose und zeichnet sich somit durch eine hohe Produktspezifität aus. Dieses Enzym ist daher besonders gut für die Herstellung dieses Tetrasaccharides geeignet (7). Maltotetraose konnte früher nur unspezifisch mit zahlreichen Nebenprodukten durch Säurehydrolyse von Stärke (8) oder durch den Abbau von Amylose mit α-Amylase (9) gewonnen werden. Um die Nebenprodukte aus den Hydrolysaten zu entfernen, waren aufwendige chromatographische Verfahren notwendig.

Ein Verfahren zur Herstellung von konzentriertem Maltotetraosesirup aus Stärke mit Hilfe der Amylase aus Pseudomonas stutzeri wurde beschrieben (10). Um bei diesem Verfahren die Ausbeute zu erhöhen, wird zur Spaltung der α-1,6-glykosidischen Bindungen Pullulanase (11) zugegeben. Kürzlich wurde von uns ein Verfahren zur spezifischen Bestimmung von β-Amylase in Gegenwart von α-Amylase in Gerstenmalz entwickelt, das Maltotetrait als Substrat verwendet (12, 13). Dieser Zuckeralkohol wurde durch Reduktion von Maltotetraose mit Natriumboranat hergestellt.

In der Zwischenzeit wurden von anderen Autoren Amylasen mit einer ebenfalls hohen Produktspezifität beschrieben, mit denen man Hydrolysate herstellen kann, die hauptsächlich Maltopentaose (14) oder Maltohexaose (15) enthalten.

Seit 1973 wurden am Lehrstuhl für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin Wirkungsmuster und Eigenschaften der Maltotetraose-bildenden Amylase untersucht (16, 17). Auf Grund der Tatsache, dass quervernetzte blaugefärbte Stärke, die nor-

malerweise von Exoamylasen nicht abgebaut wird (18 - 20), von der Amylase aus Pseudomonas stutzeri hydrolysiert werden kann, haben sich die folgenden Versuche darauf konzentriert, ob neben dem Exo-Mechanismus, wie er von ROBYT und ACKERMAN beschrieben wurde (6), ein endogener Abbau des Substrats durch die Amylase stattfindet.

Während ROBYT und ACKERMAN die Maltotetraose-bildende Amylase nur durch Proteinfällungen gereinigt haben (6), war es für die weiteren Untersuchungen erforderlich, das Enzym affinitäts-chromatographisch (17) und durch Chromatographie an Hydroxylapatit zu reinigen. Mit den gereinigten Amylase-Präparaten wurden im Rahmen dieser Arbeit die molekularen Eigenschaften des Enzyms untersucht und kinetische Messungen durchgeführt.

Weiterhin war es von Interesse zu untersuchen, wie die extrazellulär gebildete Maltotetraose von Pseudomonas stutzeri verwertet werden kann. Während die meisten bakteriellen Amylasen aus Stärke neben höheren Dextrinen auch kurzkettige Maltodextrine freisetzen (21, 22), bildet Pseudomonas stutzeri als einziges Bakterium eine Amylase mit einer hohen Produktspezifität für Maltotetraose (6, 7, 21).

Kürzlich wurde von WÖBER der Metabolismus von Maltodextrinen bei Pseudomonas stutzeri untersucht. Nach diesen Ergebnissen sind für die Verwertung von Stärke neben der Maltotetraohydrolase, eine Pullulanase, Maltodextrin-Phosphorylase und Amylomaltase notwendig (23). Eine Maltodextrin-Permease wurde nicht spezifisch nachgewiesen, dafür wurde die Tatsache, dass Maltose und Maltodextrine von der Zelle aufgenommen werden, als indirekter Beweis für die Existenz eines Maltodextrin-Transportsystems angesehen. -

Die Amylomaltase (E.C.2.4.1.25) wurde zuerst von MONOD u. TORRIANI in Escherichia coli entdeckt (24, 25) und übernimmt dort für den Stoffwechsel von Maltodextrinen eine wichtige Funktion (26, 27). Nach WIESMEYER und COHN (28) ist dieses Enzym eine Glycosyltransferase, welche den nicht reduzierenden Glucoseanteil von Maltose auf ein Maltodextrin als Akzeptormolekül überträgt. Neuere Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass Maltose kein typisches Substrat für die Amylomaltase ist, sondern dass Maltodextrine, wie z.B. Maltotriose, Maltotetraose und Maltopentaose, wesentlich bessere Substrate darstellen (29, 30).

Die Amylomaltase aus Escherichia coli ist bereits von WIESMEYER und COHN gereinigt und charakterisiert worden (31, 28), während das Enzym aus Pseudomonas stutzeri bisher nur durch Aktivitätsmessungen im zellfreien Extrakt nachgewiesen wurde (23). Es war daher von Interesse, die Amylomaltase aus Pseudomonas stutzeri zu isolieren und zu charakterisieren, wobei die Wirkungsmuster des Enzyms aus Pseudomonas stutzeri mit der Amylomaltase aus Escherichia coli verglichen wurden.

Eine ähnliche Reaktion wie bei der Amylomaltase wird vom D-Enzym (Disproportionating Enzyme/E.C. 2.4.1.25) katalysiert. Während man annimmt, dass die Amylomaltase nur Glucosereste überträgt, ist das D-Enzym in der Lage, Maltodextrinbruchstücke auf verschiedene Akzeptormoleküle zu übertragen (32). Das D-Enzym wurde zuerst von PEAT et al. in der Kartoffel nachgewiesen (33, 34). Später wurde das Enzym aber auch in anderen höheren Pflanzen (35), in Bakterien (36, 37) und tierischem Gewebe (38) gefunden. In Pseudomonas stutzeri wurde dieses Enzym noch nicht nachgewiesen.

Bisher ist das gleichzeitige Vorkommen von Amylomaltase und D-Enzym nicht beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher neben der Reinigung von Amylase und Amylomaltase das D-Enzym aus dem Zellextrakt von Pseudomonas stutzeri isoliert und charakterisiert.

2. EXPERIMENTELLES

2.1. Material

2.1.1. Mikroorganismen

Pseudomonas stutzeri NRRL 3389 wurde freundlicherweise von Dr. J.F. ROBYT, Iowa State University, Ames, USA, zur Verfügung gestellt. Der Organismus wurde auf Schrägagar mit 1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Yeast-Extract, 0,28 % K_2HPO_4 (wasserfrei), 0,1 % KH_2PO_4 (wasserfrei), 1 % löslicher Stärke und 3 % Agar bei 8 °C aufbewahrt. Die Kulturen wurden alle drei Monate auf frischen Agar übergeimpft und 24 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Escherichia coli ML 30 stammte von Dr. H. SCHWINN, Universität Mainz. Das Zellmaterial wurde auf Standard-I-Nähragar aufbewahrt und bei 8 °C gelagert. Alle drei Monate wurden die Kulturen auf neuen Agar übergeimpft und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Agar-Agar, Bacto-Trypton und Yeast-Extract lieferte Difco Laboratories, Detroit, USA. Standard-I-Nähragar wurde von Merck, Darmstadt, bezogen. Als Antischaummittel wurde während der Fermentation Polypropylen-Glykol-2000 (Baker, Deventer, Holland) verwendet.

Hydroxylapatit DNA-Grade, Bio-Gel A-1,5 (200 - 400 mesh), Bio-Gel P-2 (minus 400 mesh), Bio-Gel P-100 (100 - 200 mesh) und Bio-Gel P-150 (100 - 200 mesh) wurden von Bio-Rad Laboratories, München, geliefert.

Sepharose 6 B, Sepharose 6 B cross-linked und Sephadex G-100 superfine, DEAE-Sephadex A-50, Dextran 100, Dextran 2000 und der PHADEBAS ® - Amylase - Test stammten von Pharmacia, Freiburg.

Für die Gaschromatographie wurden folgende Chemikalien und Reagenzien verwendet: Die stationäre Phase OV-17 wurde von Pierce Chemical Company, Rockford, USA, bezogen. High Performance Chromosorb G AW-DMCS 80/100 mesh der Firma Johns Manville wurde von Lehmann & Voss, Hamburg, geliefert. Trimethylchlorsilan (TMCS) und Hexamethyldisilazan (HMDS) stammten von Serva, Heidelberg. Alle anderen

Chemikalien zur Gaschromatographie wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Für die Diskelektrophorese wurden folgende Chemikalien von Serva, Heidelberg, bezogen: Acrylamid 2 x krist., p.A., N, N' - Methylenbisacrylamid 2 x krist., reinst., Dodecylsulfat Na-Salz, krist., reinst.,
TEMED (N, N, N', N' - Tetramethyläthylendiamin) reinst., 2-Mercaptoäthanol reinst., Glycin, p.A., und Coomassiebrillantblau G-250, rein.
Alcianblau stammte von Bio-Rad Laboratories, München. Dimethylsuberimidat wurde von Kodak, Rochester, USA, bezogen. Alle weiteren Chemikalien für die Diskelektrophorese hatten den Reinheitsgrad "zur Analyse" und stammten von Merck, Darmstadt.
Amylopektin, Albumin aus Hühnerei, Rinderserumalbumin, Myoglobin vom Pferd und α-Amylase aus Bacillus subtilis wurden von Serva, Heidelberg, bezogen. Das Pullulan war ein Geschenk von Dr.-Ing. D. BONSE. 1-Ortho- α-D-Glucopyranosid, Guanidinhydrochlorid, Dithioerythritol, Schardinger - α -Dextrin und Schardinger - β -Dextrin lieferte die Firma Sigma Chemie, München. Phenyl-ß-D-Glucopyranosid wurde von Koch-Light, England, bezogen. Parachloromercuribenzoat (PCMB) lieferte Merck-Schuchardt, München.

Triäthanolamin · HCl, das Biuret-Reagenz und alle weiteren Eichproteine, Enzyme und Coenzyme für die Säulenchromatographie, Diskelektrophorese und die enzymatischen Versuche wurden, soweit nicht anders angegeben, von Boehringer, Mannheim, bezogen.

ß-Grenzdextrin von Amylopektin wurde wie bei WHELAN hergestellt (39).

Für die Herstellung von Isomaltose und Isomaltotriose wurde Dextran 100 mit einer Dextranase aus Penicillium species (Sigma) abgebaut und das Hydrolysat gelchromatographisch fraktioniert.

Zur Herstellung von Orcin-Schwefelsäure wurde 1 g Orcin (reinst.) in 1 Liter kalter 70%iger Schwefelsäure gelöst. Die Reagenzlösung wurde in einer Braunglasflasche aufbewahrt.

Alle weiteren Chemikalien hatten den Reinheitsgrad "zur Analyse" und stammten, wenn nicht anders angegeben, von Merck, Darmstadt.

2.1.3. Herstellung von Maltotetraose

Grössere Mengen von Maltotetraose werden durch Hydrolyse von Stärke mit der G 4-bildenden Amylase aus Pseudomonas stutzeri gewonnen.

Hierzu wurden 50 g lösliche Stärke in 0,03 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gelöst und bis zur Jodnormalität mit 10 U Amylase pro Gramm Stärke bei 40 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen unterbrochen und das Stärkehydrolysat gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 100 ml Wasser gelöst und das darin enthaltene hochmolekulare Grenzdextrin mit 400 ml Aceton, zur Rückstandsanalyse, gefällt. Das Grenzdextrin wurde 15 Minuten bei 20.000 xg (0 °C) abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde das Aceton am Rotationsverdampfer abgedampft.

In der verbliebenen Lösung befanden sich neben der Maltotetraose noch andere Oligosaccharide, die entfernt werden mussten. Zur chromatographischen Reinigung der Maltotetraose werden 2 g der lyophilisierten Lösung in 10 ml Wasser gelöst und mittels einer gasdichten Hamilton-Spritze auf eine Säule mit Bio-Gel P-2, minus 400 mesh gegeben. Das Gelbett hatte eine Länge von 42 x 5 cm und wurde auf 55 °C temperiert. Die Säule wurde mit 100 ml Wasser pro Stunde eluiert. Das Eluat wurde in einem Fraktionensammler (LKB, Ultrorac 7000) aufgefangen und in 120 Fraktionen von jeweils 5 ml unterteilt.

Zum Nachweis der Kohlenhydrate in den einzelnen Fraktionen wurden 20 µl Eluat entnommen und mit 1 ml Orcin-Schwefelsäure gemischt. Die Lösung wurde 15 Minuten in einem Wasserbad auf 100 °C erwärmt und nach dem Abkühlen mit 8 ml Wasser verdünnt. Die Transmission wurde mit einem Filterphotometer (Zeiss PL 4) bei 436 nm gegen einen Blindwert gemessen. Anschliessend wurden die Transmissionswerte graphisch gegen die Anzahl der Fraktionen aufgetragen.

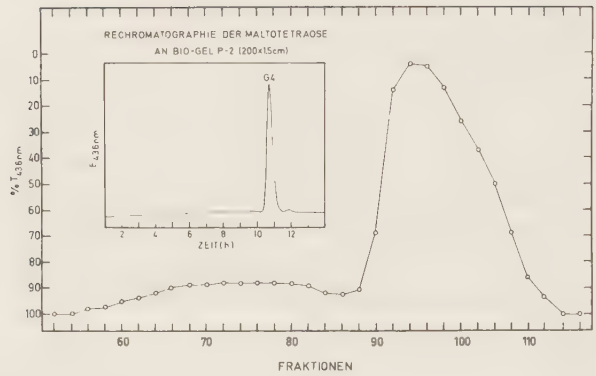

Abb. 1. Gelchromatographische Reinigung von Maltotetraose nach Fällung der Grenzdextrine mit Aceton. Chromatographische Bedingungen: Bio-Gel P-2, minus 400 mesh; Gelbettlänge, 42 x 5 cm; Säulentemperatur, 55 °C; Elutionsmittel, Wasser; Durchflussrate, 100 ml/h; gesammelt wurden 5 ml Eluat pro Fraktion. Probe, 2 g G 4 gelöst in 10 ml H_2O. Oben links: Rechromatographie der gereinigten Maltotetraose aus den Fraktionen 91 - 102 an Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm).

Abbildung 1 zeigt ein solches Elutionsdiagramm, mit dessen Hilfe diejenigen Fraktionen ermittelt und gesammelt wurden, die ausschliesslich G 4 enthielten. Die Lösung mit der reinen Maltotetraose (Fraktion 91 - 102) wurde gefriergetrocknet und zur Prüfung der Reinheit an einer Bio-Gel P -2-Säule (200 x 1,5 cm) rechromatographiert.

Die chromatographisch reine Maltotetraose wurde als Substrat für die Messung der Transferase-Aktivität, sowie für kinetische Studien verwendet.

2.1.4. Herstellung von Maltodextrinen

Maltotriose wurde durch Abbau von Pullulan mit Pullulanase aus Aerobacter aerogenes hergestellt (40, 41). Da das Pullulanhydrolysat neben Maltotriose etwa 5% Maltotetraose enthält (42), wurde das Tetrasaccharid gelchromatographisch abgetrennt.

Maltopentaose und Maltohexaose stammten aus dem Abbau von Amylose mit α-Amylase aus Bacillus subtilis und wurden, wie bei JOHN beschrieben, gereinigt (43).

2.1.5. Reinigung von Amylomaltase aus E. coli ML 30

Die Amylomaltase aus E. coli ML 30 wurde zum Vergleich der Wirkungsmuster mit den Transferasen aus Ps. stutzeri benötigt.

Dazu wurde E. coli ML 30 23 Stunden aerob bei 37°C und pH 7,0 in einem synthetischen Medium, das 0,4% Maltose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, in einem Reziprokschüttler (New Brunswick) gezüchtet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 Min. bei 48.000 xg, 0°C) und mit kaltem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen.

Das gewaschene Zellmaterial wurde im Verhältnis 1 : 5 (g Zellen Nassgewicht / ml Puffer) in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) suspendiert und mit einem Branson-Sonifier S-125 (Branson Sonic Power, Danbury, USA) etwa drei Minuten mit Ultraschall aufgeschlossen. Das Sonificat wurde 30 Minuten bei 48.000 xg (0°C) zentrifugiert. Danach wurden im klaren Überstand die Aktivität der Amylomaltase und die Proteinkonzentration gemessen - wie in den Kapiteln 2.2.4. und 2.2.5. beschrieben -.

Für die Ammoniumsulfatfällung der Proteine (44) wurde dem klaren Überstand solange fein zermörsertes Ammoniumsulfat zugegeben, bis eine Sättigung von 70% erreicht war. Der Niederschlag wurde 10 Minuten bei 40.000 xg (0°C) abzentrifugiert. Nach diesem Reinigungsschritt wurde die spezifische Amylomaltase-Aktivität im Niederschlag gemessen.

Als dritter Reinigungsschritt wurde der Ammoniumsulfat-Niederschlag an Bio-Gel A-1,5 chromatographiert. Die Säule wurde mit dem gequollenen Gel nach der Methode von FLODIN (45) gefüllt und mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) bei einer Fliessrate von 12 ml/h und 6°C Säulentemperatur eluiert. Das gefällte Enzym wurde in 8,0 ml Puffer gelöst und enthielt 49,5 mg Protein pro ml Probelösung. Die spezifische Aktivität der Probe betrug 36 U/mg Protein. Zum Nachweis der Proteine im Eluat wurde die Transmission des Eluats bei 280 nm mit einem Durchflussphotometer (Uvicord II, LKB) kontinuierlich gemessen und registriert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 3 ml mit Hilfe eines Fraktionensammlers unterteilt. In den gesammelten Fraktionen wurde die Amylomaltase-Aktivität ermittelt.

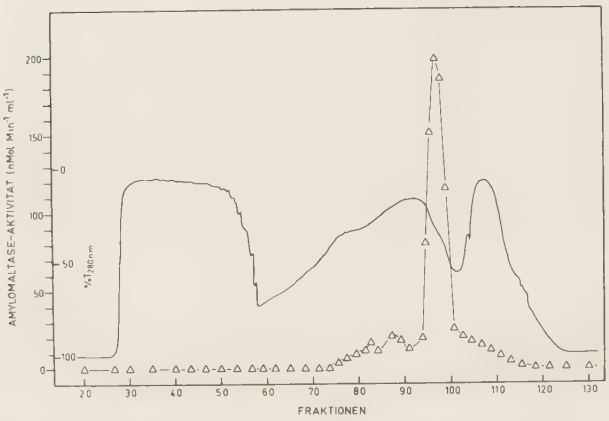

Abb. 2 Chromatographie der Amylomaltase aus E. coli ML 30 an Bio-Gel A-1,5. Gelbettlänge, 68 x 2,5 cm; Säulentemperatur, 6°C; Elution mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0); Fliessrate, 12 ml/h; gesammelt wurden 3 ml pro Fraktion. Probe, 8,0 ml (49,5 mg Protein/ml; spezifische Aktivität 36 U/mg Protein). Transmission bei 280 nm (—); Amylomaltase-Aktivität (—△—).

Abbildung 2 zeigt die Chromatographie der Amylomaltase aus E. coli an Bio-Gel A-1,5. Das Chromatogramm zeigt zwischen den Fraktionen 73 und 91 zwei Aktivitätspeaks mit geringen Transferase-Aktivitäten, während die höchste Amylomaltase-Aktivität zwischen den Fraktionen 94 bis 102 festgestellt werden konnte. Das Protein in den Fraktionen 94 bis 102 wurde durch Ammoniumsulfatfällung (70% Sättigung, 4°C) konzentriert.

Tab. 1: Isolierung der Amylomaltase aus E. coli ML 30

Reinigungs-schritt	Volumen-Aktivität U/ml	Protein mg/ml	Spezifische Aktivität U/mg Protein	Reinigungs-faktor
1) Sonificat	138	19	7,3	1,0
2) Fällung m. Ammonium-sulfat (70% Sättigung)	431	12	36	5
3) Chromatographie an Bio-Gel A-1,5	368	1,2	307	42

Die Reinigungsschritte sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, erhielt man nach der Chromatographie an Bio-Gel A-1,5 eine 42-fache Anreicherung mit einer spezifischen Amylomaltase-Aktivität von 307 U/mg Protein. Dieses Präparat wurde zur Herstellung von Wirkungsmustern benutzt, um einen direkten Vergleich mit den Wirkungsmustern der Transferasen aus Ps. stutzeri zu ermöglichen.

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von Pseudomonas stutzeri im Fermenter

Pseudomonas wurde aerob in einem Medium kultiviert, das aus 1% Bacto-Trypton, 0,5% Yeast-Extract, 0,28% K_2HPO_4 (wasserfrei), 0,1% KH_2PO_4 (wasserfrei) und 1% löslicher Stärke bestand (16, 17). Zur Anzucht der Zellen wurden 5 Erlenmeyerkolben à 500 ml mit jeweils 100 ml Medium gefüllt und mit der Stammkultur beimpft. Die Vorkultur wurde 16 Stunden in einem Reziprokschüttler (New Brunswick) bebrütet und anschliessend zur Animpfung der Massenzüchtung in einem 10-Liter-Fermenter (Biostat V, Braun-Melsungen) verwendet.

Das Inokulum aus der Schüttelkultur wurde zu acht Liter Medium gegeben, welches als Antischaummittel noch 1 ml Polypropylen-Glykol-2000 enthielt. Es wurde elf

Stunden in einer Batch-Kultur bei 30° Celsius, einer Belüftungsrate von 0,5 Liter Luft/Liter Kulturflüssigkeit und einer Rührgeschwindigkeit von 700 UPM gezüchtet. Während der Kultivierung wurde stündlich die Zelldichte bei 620 nm gemessen und die Amylase-Aktivität mit dem PHADEBAS®-Amylase-Test bestimmt. Die Züchtung wurde zu Beginn der stationären Phase abgebrochen und der Fermenterinhalt (20 Min. bei 14.000 xg, 0°C) zentrifugiert.

Das Zellmaterial wurde für die Isolierung und Reinigung der Transferase benötigt und daher mehrfach mit eiskaltem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und bei - 18° Celsius aufbewahrt. Die gefrorenen Zellen konnten ohne Aktivitätsverluste einige Monate gelagert werden. Aus der zellfreien Kulturflüssigkeit wurde die Amylase isoliert.

2.2.2. Bestimmung der Amylase-Aktivität

Für die Bestimmung der Amylase-Aktivität wurde der PHADEBAS®-Amylase-Test (Pharmacia, Freiburg) eingesetzt, der von CESKA et al. entwickelt wurde (18, 46, 47). Die Testtablette enthält ein unlösliches quervernetztes Stärkepolymer, an das blaue Farbstoffgruppen kovalent gebunden sind, sowie Puffersalze, die im Test einen 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,0) ergeben. Die Amylase hydrolysiert das Stärkederivat zu wasserlöslichen blauen Spaltprodukten, deren Farbintensität bei 620 nm gemessen wird. Mit einer im Test enthaltenen Standardkurve wird die Extinktion direkt in die zugehörige Amylase-Aktivität transformiert. Eine Amylase-Einheit ist als die Enzymmenge definiert, welche pro Minute die Hydrolyse von 1 µmol glykosidischer Bindungen bei 37°C katalysiert.

Der Test wurde, wie in der Arbeitsanleitung beschrieben, durchgeführt. Bei hohen Amylase-Aktivitäten, deren Extinktion den Wert 0,9 überstieg, wurden die Proben entsprechend verdünnt. Die abgelesenen Amylase-Aktivitäten wurden dann mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.2.3. Bestimmung der Maltodextrin-Phosphorylase-Aktivität

Die Maltodextrin-Phosphorylase (E.C. 2.4.1.1) katalysiert die Bildung von Glucose-1-Phosphat aus Maltodextrinen und anorganischem Phosphat (48). Das Substrat für die Aktivitätsbestimmung wurde durch Inkubation von Maltotetraose mit Amylomaltase aus E. coli ML 30 (24 h in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,8 bei 30 °C) hergestellt. Nach der Hitzeinaktivierung und Gefriertrocknung wurde das synthetische Maltodextringemisch durch Chromatographie an Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm) von Glucose, Maltose und Maltotriose gereinigt, da Maltotetraose das kleinste Maltodextrin ist, das als Substrat von dem Enzym phosphoryliert werden kann (48).

Die Maltodextrin-Phosphorylase wurde nach der Methode von MUNCH-PETERSEN und KALCKAR bestimmt (49). Hierfür wurde die Probe mit einer 1%igen Maltodextrinlösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) inkubiert und nach 30 Minuten die Menge an gebildetem Glucose-1-Phosphat als Maß für die Phosphorylase-Aktivität, wie bei BERGMEYER (50) beschrieben, bestimmt.

2.2.4. Bestimmung der Transferase-Aktivität

Die Amylomaltase-Aktivität und die Aktivität des D-Enzyms wurde durch Inkubation mit 15 mmol Maltosetetraose als Substrat in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,6) bei 30 °C bestimmt. Der Testansatz wurde nach einer entsprechenden Inkubationszeit (10 - 30 Minuten) hitzeinaktiviert (5 Min. bei 90 °C), und anschliessend die freigesetzte Glucose mit Hilfe der Hexokinase-Methode ermittelt. Der Hexokinase-Test wurde nach der Arbeitsanleitung von Boehringer-Mannheim (51) durchgeführt. Eine Transferase-Einheit ist definiert als diejenige Enzymmenge, welche unter den genannten Testbedingungen pro Minute 1 nmol Glucose im Milliliter Inkubationsansatz bildet.

2.2.5. Proteinbestimmung

Das Protein wurde bei grösseren Konzentrationen als 500 µg Protein/ml mit Hilfe der Biuret-Methode bestimmt (52). Dabei wurde das Protein bei kleineren Konzentrationen als 4 mg/ml in der Probe mit 3 M TCA gefällt, wie in der Arbeitsanleitung von Boehringer-Mannheim beschrieben wurde (53).

Bei geringerem Proteingehalt als 500 µg Protein/ml wurde die Proteinkonzentration nach der Folin-Methode gemessen (54), wie sie von SCHACTERLE und POLLACK modifiziert wurde (55).

2.2.6. Konzentrierung der Proteinlösungen

Das Säuleneluat wurde durch Ultrafiltration konzentriert und dialysiert (Amicon, Modell 202 / Membran PM 10 und Minicon - B, Typ B 15/PM 15).

2.2.7. Bestimmung der reduzierenden Zucker

Die reduzierenden Zucker wurden nach der Dinitrosalicylsäure-Methode bestimmt. Bei dieser Reaktion wird die 3,5-Dinitrosalicylsäure beim Erhitzen mit Zuckern in alkalischer Lösung zur gelborange gefärbten 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert (56, 57), deren Farbintensität bei 546 nm photometrisch gemessen wird. Die Bestimmung wurde nach RICK und STEGBAUER durchgeführt (58).

2.2.8. Chromatographie der Kohlenhydrate an Bio-Gel P-2

Um die Wirkungsmuster der gereinigten Enzyme darzustellen, wurden die gebildeten Kohlenhydrate an einer Polyacrylamidgel-Säule nach der Methode von JOHN et al. (59, 60) gelchromatographisch getrennt und analysiert. Bei diesem Verfahren verlassen die getrennten Kohlenhydrate die Säule in der Reihenfolge abnehmender Molekülgrösse und werden im Eluat mit einem automatischen Analysensystem nachgewiesen (59 - 61). Dieser Nachweis beruht auf der Reaktion der Kohlenhydrate mit Orcin-Schwefelsäure zu einer gefärbten Verbindung (62, 63), deren Farbintensität kontinuierlich bei 436 nm gemessen und mit einem Linienschreiber registriert wird.

Als weiterer Detektor wurde ein Differentialrefraktometer (Modell 2025/50 Knauer, Berlin) mit einem angeschlossenen Linienschreiber (Hewlett-Packard Typ 7130 A), der mit einem "Event-Marker" zur Kennzeichnung der Fraktionen ausgerüstet war, verwendet. Diese Geräte wurden, zusammen mit einem Fraktionensammler, bei präparativen Läufen eingesetzt.

2.2.9. Reinigung der Amylase aus Pseudomonas stutzeri

Die Reinigung der Amylase erfolgte in mehreren Schritten aus der zellfreien Kulturlösung. Nach jedem Reinigungsschritt wurde die Amylase-Aktivität und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

- Konzentrierung der extrazellulären Amylase

Die zellfreie Kulturlösung wurde zunächst durch Gefriertrockung von 8 l auf 3,2 l eingeengt. Durch diesen Vorgang wurde der von Ps. stutzeri gebildete Schleim (64) als Gallerte ausgeschieden und konnte nach dem Auftauen der konzentrierten Lösung in der Kälte abzentrifugiert werden (10 Min. bei 40.000 xg, 0°C).

Nach der Konzentrierung des Mediums und der Entfernung des Schleims wurde aus dem klaren Überstand das Protein mit Ammoniumsulfat gefällt. Dabei wurde bei 4°C solange Ammoniumsulfat zugegeben, bis eine Sättigung von 45% (44) erreicht und keine Aktivität im Überstand festzustellen war. Das gefällte Protein wurde 10 Minuten bei 45.000 xg (0°C) abzentrifugiert. Der Ammoniumsulfat-Niederschlag zeigte während eines Zeitraumes von sechs Monaten keine wesentliche Aktivitätsabnahme.

- Affinitätschromatographie

Nach der Fällung wurde eine affinitätschromatographische Trennung der Amylase an Sephadex G-100, wie bereits beschrieben (17), durchgeführt. Dazu wurde Sephadex G-100 superfine in 0,03 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gequollen. Die Säule (8 x 2,5 cm) wurde bei 8°C Säulentemperatur mit 0,03 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und einer Fliessrate von 18 ml/h eluiert.

Als Probe wurde gefälltes Enzym in 45 ml Startpuffer gelöst und über ein gekühltes Probe-aufgabegefäss auf die Säule eluiert. Die Proteinkonzentration betrug in der Probe 51 mg/ml, die spezifische Amylase-Aktivität 12 U mg/Protein. Nachdem die nicht adsorbierten Substanzen der Probe von der Säule eluiert waren, wurde die an das Dextrangel gebundene Amylase mit einer 1%igen Stärkelösung nach Zulkowsky in 0,03 M Phosphatpuffer (pH 7,0) von der Säule gelöst. Während der Chromatographie wurde die Transmission bei 280 nm gemessen und das Eluat in Fraktionen von 3 ml unterteilt. In den einzelnen Fraktionen wurde dann die Amylase-Aktivität

ermittelt. Anschliessend wurden die Fraktionen mit Amylase-Aktivität vereint und in einem Ultrafiltrationsgerät (Amicon) konzentriert. Mit der konzentrierten Enzymlösung wurde der nächste Reinigungsschritt durchgeführt.

- Chromatographie an Hydroxylapatit

Hydroxylapatit ist eine Form des Calciumphosphats und als Trennmaterial in der präparativen Biochemie weit verbreitet. Eine Trennung kommt dadurch zustande, dass sich das Protein mit seinen Carboxylgruppen an das Calcium lagert. Durch Elution mit einem Phosphatpuffergradienten ist es möglich, die Proteine vom Hydroxylapatitgel zu verdrängen, da Phosphate sich fester an das Calcium binden als die amphoteren Proteine. Andererseits bindet sich das Protein mit den basischen Gruppen an die Phosphatgruppen, und sie können durch einen Natrium-Gradienten verdrängt werden (65).

Das Gel (DNA grade Bio-Gel HTP, Bio-Rad Laboratories, München) wurde nach Angaben des Herstellers gequollen und in die Säule gefüllt (66). Alle weiteren chromatographischen Bedingungen wurden, soweit nicht anders angegeben, wie bei BERNARDI durchgeführt (67).

Das Gelbett der Säule hatte eine Länge von 57 x 0,9 cm, die Säulentemperatur betrug 8 °C, und die Säule wurde mit 8 ml/h eluiert. Der Startpuffer war ein 0,005 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8), während als Gradientenpuffer ein 0,150 M Na-P-Puffer (pH 6,8) verwendet wurde. Zur Gradientenelution wurde ein Autograd- Gradientenmischer (Technicon, Bad Vilbel) verwendet, der in zwei Kammern mit jeweils 150 ml Start- und Gradientenpuffer gefüllt war. Das Probevolumen betrug 2,0 ml, die Proteinkonzentration in der Probe war 17,1 mg Protein/ml. Die spezifische Amylase-Aktivität betrug 195 U/mg Protein. Während der Chromatographie wurde das Enzym mit einem linearen Gradienten von der Säule eluiert und das Eluat in Fraktionen von 1,5 ml unterteilt. Die Transmission des Eluats wurde bei 280 nm gemessen und die Amylase-Aktivität unmittelbar nach der Chromatographie in den Fraktionen ermittelt.

Die Fraktionen mit Amylase-Aktivität wurden als Fraktion A (gesammelt aus Fraktion 67 - 72) und als Fraktion B (gesammelt aus Fraktion 81 - 87) vereinigt und elektrophoretisch untersucht. Die durch Chromatographie an Hydroxylapatit gereinigte Amylase

wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

2.2.10. Methoden zur Charakterisierung der Amylase aus Pseudomonas stutzeri

- Diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Es wurde die Methode von ORNSTEIN (68) und DAVIS (69) benutzt. Als Gerät diente eine Flachgel-Elektrophorese-Apparatur von Desaga, Heidelberg.

Die Herstellung der Trenn- und Sammelgele sowie des Elektrodenpuffers erfolgte wie bei GABRIEL (70).

Für die meisten Trennungen wurde ein Trenngel (pH 8,9) mit 10% Acrylamid und 0,1% N, N' - Methylenbisacrylamid verwendet. Das Gel wurde chemisch durch Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat polymerisiert.

Das Sammelgel (pH 6,7) enthielt 2,5% Acrylamid und 0,65% N, N' - Methylenbisacrylamid und wurde mit Riboflavin als Photokatalysator polymerisiert.

Der Elektrodenpuffer (pH 8,3) enthielt 0,005 M Tris und 0,038 M Glycin. Die Proben enthielten ca. 2 - 3 mg Protein pro Milliliter 0,03 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,0), 40% Saccharose und 0,001% Bromphenolblau. Eine Probemenge von 100 µl (200 - 300 µg Protein) wurde in die Geltasche gegeben. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA und 6°C durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront den Gelblock verlassen hatte (etwa 3 h).

Die Proteinbanden wurden über Nacht in 50%iger wässriger TCA-Lösung fixiert und anschliessend 1 h bei 37°C mit 0,1% Coomassiebrillantblau G - 250 - Lösung in 50%iger TCA angefärbt. Zur Diffusionsentfärbung wurde 7%ige Essigsäure verwendet.

Die Anwesenheit von Glycoproteinen im Gel wurde mit Perjodsäure - Schiffs - Reagenz wie bei MAURER (71) und mit Alcianblau wie bei WARDI und MICHOS (72) überprüft.

- Nachweis der Amylase-Aktivität im Gel

Die Isoenzymbanden der Amylase wurden mit Hilfe der leicht modifizierten Kontaktprint-Methode von HELLER und KULKA (73) nachgewiesen. Hierfür wurden Dünnschichtplatten mit Amylose-Polyacrylamidgel (1 % Amylose, 10 % Acrylamid, 0,1 % Bis, 0,1 M Tris · HCl, pH 7,0) hergestellt. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Trenngel auf die Kontaktfilm-Platte gelegt und in einer feuchten Kammer bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Anfärben mit 0,001 N Jodlösung und dem Waschen mit warmem Wasser wurden die Amylase-Banden photographiert. +)

- Bestimmung des Molekulargewichts der Amylase mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Polypeptidketten in oligomeren Proteinen mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von SDS ist zuerst von SHAPIRO, VINUELA und MAIZEL (74) und später von WEBER und OSBORN (75) beschrieben worden. Diese häufig benutzte Methode wurde kürzlich von LAEMMLI (76) durch Einführung eines Sammelgels und eines diskontinuierlichen Puffersystems modifiziert. Dadurch wurde der Zeitbedarf für die Elektrophorese wesentlich verkürzt, und die Trennschärfe konnte gesteigert werden. In diesem verbesserten diskontinuierlichen Gelsystem ist die relative Wanderungsstrecke der Eichproteine eine lineare Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichts, wie es schon früher für das kontinuierliche System beschrieben wurde (74, 75).

Für die Molekulargewichtsbestimmung der Amylase wurde die Methode von LAEMMLI (76) benutzt. Das Trenngel enthielt 10 % Acrylamid, 0,038 M Tris · HCl (pH 8,8) und 0,1 % SDS. Es wurde mit TEMED und Ammoniumpersulfat polymerisiert.

Das Sammelgel mit 2,5 % Acrylamid enthielt ebenfalls Tris · HCl-Puffer (pH 6,8) und 0,1 % SDS. Dieses Gel wurde durch Photopolymerisation mit Riboflavin als Katalysator hergestellt.

Der Elektrodenpuffer (pH 8,3) enthielt 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin und 0,1 % SDS. Die Proben (0,4 ml) enthielten folgende Endkonzentrationen: 0,4 - 0,8 mg Protein, 0,05 M Tris · HCl (pH 6,8), 1 % SDS, 5 % 2-Mercaptoäthanol, 40 % Saccharose und ca. 0,001 % Bromphenolblau als Farbstoff. Die Proteine wurden vollständig

+) Die PAGE der Amylase und der Kontaktprint wurden freundlicherweise von Dr.-Ing. M. JOHN durchgeführt.

dissoziiert, indem die Proben 2 Minuten in kochendes Wasser gestellt wurden. In einem typischen Lauf wurden 50 µl Probelösung mit ca. 50 - 100 µg Protein (je nach Anzahl der zu erwartenden Banden) in die Geltasche gegeben. Es wurde bei einer stabilisierten Stromstärke von 30 mA solange elektrophoriert, bis die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Gelblocks erreichte (etwa 3 Stunden).

Die Proteinbanden wurden mit Coomassiebrillantblau angefärbt und die Gele mit 7%iger Essigsäure durch mehrmaliges Waschen entfärbt.

Die Beweglichkeit der Proteinbanden relativ zur Bromphenolblaufront wurde nach folgender Gleichung berechnet (75):

$$\text{Beweglichkeit} = \frac{\text{Weg der Proteinwanderung}}{\text{Länge des Gels nach dem Entfärben}} \times \frac{\text{Länge des Gels vor dem Färben}}{\text{Weg der Farbstoffwanderung}}$$

Die Beweglichkeiten wurden gegen die Molekulargewichte in halblogarithmischer Darstellung aufgetragen. Mit Hilfe einer solchen Eichgeraden wurde das Molekulargewicht der Amylase-Untereinheiten ermittelt.

- Quervernetzung von Proteinen mit Dimethylsuberimidat und anschliessender SDS-PAGE

Die intramolekulare Quervernetzung der Amylase und die intermolekulare Quervernetzung von Ovalbumin mit Dimethylsuberimidat wurde, wie bei CARPENTER und HARRINGTON (77) beschrieben, durchgeführt.

Die Amylase (3 mg/ml) reagierte bei pH 8,5 in 0,2 M Triäthanolamin mit Dimethylsuberimidat. Danach wurde SDS und 2-Mercaptoäthanol zugegeben, bis die Lösung 1%ig an beiden Komponenten war. Die Lösung wurde 2 h bei 37°C inkubiert, über Nacht bei - 10°C eingefroren und anschliessend elektrophoriert.

Ovalbumin (5 mg) wurde in 0,5 ml 0,2 M Triäthanolamin-Puffer (pH 8,5), der 3 mg Dimethylsuberimidat enthielt, gelöst. Zur Proteinlösung wurden 2% SDS und 2%

2-Mercaptoäthanol in 0,2 M Triäthanolamin (pH 8,5) gegeben. Die Mischung wurde in Trockeneis-Propanol eingefroren und 16 Stunden bei - 10 °C aufbewahrt. Anschliessend wurde die Lösung 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und danach elektrophoriert.

Für die elektrophoretische Trennung der quervernetzten Proteine an Polyacrylamidgel in Gegenwart von SDS eignet sich das Verfahren von WEBER und OSBORN (75), das von DAVIES und STARK (78) modifiziert wurde. Das Trenngel enthielt 5% Acrylamid, 0,135% N, N' -Methylenbisacrylamid und 0,1% SDS. Auf ein Sammelgel wurde verzichtet. Der Elektrodenpuffer war 0,1 M an Borat, 0,1 M an Natriumacetat und enthielt 0,1% SDS bei pH 8,5.

Die Proben enthielten etwa 50 µg Protein und wurden in einer Lösung, die 40% Saccharose und 0,01% Bromphenolblau enthielt, in die Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 100 mA durchgeführt. Sobald die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gelblocks erreicht hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen, das Gel vermessen und der Weg der Farbstofffront ermittelt. Anschliessend wurde mit Coomassiebrillantblau angefärbt und im Querentfärbebad (Desaga, Heidelberg) elektrophoretisch entfärbt.

Die Beweglichkeit der Proteinbanden relativ zur Bromphenolblaufront wurde gegen den Logarithmus der Molekulargewichte von quervernetztem Ovalbumin aufgetragen. Die resultierende Eichgerade gestattet es, die Molekulargewichte anderer Proteine aufgrund ihrer Beweglichkeit zu bestimmen.

- Chromatographie der Amylase an Sepharose 6 B - CL in Gegenwart von 6 M Guanidinhydrochlorid

Eine weitere Methode zur genauen und einfachen Bestimmung des Molekulargewichts einer Polypeptidkette ist die Chromatographie an Agarose-Gel unter denaturierenden Bedingungen, wie sie von MANN und FISH beschrieben wurde (79).

Die Proteinproben (10 mg) wurden in 0,5 ml 6 M Gu · HCl, 0,1 M 2-Mercaptoäthanol gelöst, und der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 8,6 eingestellt. Die Probe wurde über Nacht unter diesen reduzierenden Bedingungen bei Raumtemperatur stehengelassen. Zur Carboxymethylierung der SH-Gruppen wurde ein geringer Überschuss (bezogen auf 2-Mercaptoäthanol) von fester Jodessigsäure zur Probe

gegeben, und der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH wieder auf 8,6 eingestellt (Nitroprussid-Test zum Nachweis von 2-Mercaptoäthanol in der Probe). Um die Carboxymethylierung vollständig ablaufen zu lassen, wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur etwa 1 h stehengelassen. Anschließend wurde zentrifugiert, und 0,5 ml des klaren Überstandes wurde auf eine Sepharose 6B-CL-Säule gegeben, die vorher mit 6 M Guanidinhydrochlorid äquilibriert war. Die Bereitung des Elutionsmittels und das Packen der Agarose-Säule erfolgte wie bei MANN und FISH (79).

Die Sepharose 6B-CL-Säule (78 x 1,5 cm) wurde bei einer Temperatur von 20 °C mit 6 M Gu · HCl in 0,05 M Acetatpuffer (pH 5,5) und einer Fließrate von 4 ml / cm^2 / h eluiert. Die UV-Absorption des Eluats wurde im Durchfluß mit einem Uvicord II (LKB) gemessen.

Eine Probe von 0,5 ml enthielt etwa 5 mg Protein und wurde mittels einer gasdichten Spritze direkt in den Elutionsmittelstrom eingespritzt. Es wurden Fraktionen mit 1,5 ml gesammelt. Zur Bestimmung des Elutionsvolumens (V_e) einer Substanz wurde das Eluat von der Probeaufgabe bis zum Erscheinen des Peaks der Substanz in maximaler Konzentration im Fraktionensammler aufgefangen und anschließend gewogen.

Das äußere Volumen der Säule (V_o) wurde durch Chromatographie von 2 mg Dextran 2000 ermittelt. Zur Bestimmung des inneren Volumens (V_i) wurde 1 mg DNP-Alanin (M.G. 255) zusammen mit den Eichproteinen chromatographiert.

Aus diesen Elutionsparametern wurde der Verteilungskoeffizient K_d wie folgt berechnet:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

Für die Darstellung einer Eichkurve wurde $K_d^{1/3}$ gegen das Molekulargewicht^{0,555} aufgetragen.

- Enzymatische Versuche

Zur Darstellung einer Zeit-Umsatzkurve der Amylase aus Pseudomonas stutzeri mit Stärke als Substrat wurde wie folgt verfahren: 80 mg Stärke nach Zulkowsky wurden in 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gelöst und im Eisbad mit einer Amylase-Aktivität von 1,2 U im Inkubationsansatz versetzt und gut durchmischt. Das Enzym-

Substratgemisch wurde im Eisbad auf 10 Röhrchen verteilt, die anschliessend zur gleichen Zeit in ein Wasserbad von 37°C gestellt wurden, wodurch die Reaktion gestartet wurde. Die Röhrchen wurden nach festgelegten Zeiten entnommen und hitzeinaktiviert (5 Minuten bei 90°C). Der Grad der Hydrolyse wurde mit einer Bio-Gel P-2-Säule (200 x 1,5 cm) ermittelt, die vorher mit Maltotetraose geeicht war. Ausserdem wurden zur Darstellung des Abbaus von Stärke durch die Amylase 90 µl der 120-Minuten-Probe gelchromatographisch analysiert.

Für die Chromatographie des Endabbaus von Stärke durch die Amylase wurden folgende Inkubationsbedingungen gewählt: 20 mg Stärke nach Zulkowsky wurden 24 Stunden in 2,0 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 7,4 U Amylase bei 37°C inkubiert. Der enzymatische Abbau wurde durch Kochen unterbrochen und gelchromatographisch an Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm) untersucht.

- Kinetische Messungen

Der Km-Wert der Amylase aus Pseudomonas stutzeri wurde mit Stärke als Substrat und in Anwesenheit verschiedener Dextrankonzentrationen (0,25 mg Dextran/ml und 2,5 mg Dextran/ml) nach LINEWEAVER-BURK bestimmt (80). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch Bestimmung der reduzierenden Zucker mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (56 - 58).

Die Inhibitor-Konstanten K_i für Maltotetraose und Pullulan als Inhibitoren wurden nach der Methode von DIXON ermittelt (81, 82). Um die beiden Substratkonzentrationen zu erhalten, wurden die PHADEBAS®-Tabletten zermörsert und in die verschiedenen Teströhrchen eingewogen, wobei bei S_1 200 mg und bei S_2 50 mg als Substratkonzentration festgelegt wurden. Die Amylase-Aktivität betrug im Test 250 mU/ml.

Bei der Gegenüberstellung der Hemmung der Amylase aus Ps. stutzeri durch Pullulan und Dextran sowie bei der Aktivierung der Amylase durch Cycloheptamylose (Schardinger-β-Dextrin) wurde die Aktivität mit Hilfe des PHADEBAS-Tests ermittelt. Die Amylase-Konzentration betrug im Test jeweils 500 mU/ml.

- Abbau von Pullulan durch die Amylase

Zu einer 1 %igen Lösung von Pullulan in 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,0) wurden 8,4 U/ml Amylase gegeben und 18 h bei 37°C inkubiert. Das Hydrolysat wurde nach Hitzeinaktivierung gefriergetrocknet und anschliessend an Bio-Gel P-100 und Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm) gelchromatographisch untersucht. Zum Vergleich wurde ein entsprechender Ansatz mit der α-Amylase aus B. subtilis angesetzt, der jedoch nur an Bio-Gel P-100 chromatographiert wurde. Das Gelbett der Bio-Gel P-100-Säule war 34 x 2,5 cm lang (Säulentemperatur 45°C) und wurde mit Wasser bei einer Fliessrate von 25 ml/h eluiert. Als Detektor wurde ein Differentialrefraktometer verwendet.

Nach der Hydrolyse des Pullulans durch die Amylase wurden die Abbauprodukte zur Spaltung der α-1,6-glykosidischen Bindungen mit Pullulanase inkubiert (24 h, 0,1 M Phosphatpuffer, pH 5,0, 37°C). 70 µl dieses Ansatzes wurden an Bio-Gel P-2 chromatographiert.

Pullulan wurde mit Pullulanase wie folgt abgebaut: 10 mg Pullulan wurden in 1 ml 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,0) gelöst und mit 7,5 U Pullulanase 10 h bei 37°C inkubiert.

- Induktion der Amylasebildung durch Kohlenhydrate verschiedener Molekülgrösse

Pseudomonas stutzeri wurde in einem flüssigen Yeast-Extract-Bacto-Trypton-Medium mit jeweils acht verschiedenen Kohlenstoffquellen in 1 %iger Lösung kultiviert. Dazu wurden folgende Kohlenhydrate als C-Quelle gewählt: Kartoffelstärke, lösliche Stärke, Stärke nach Zulkowsky, Maisstärke, Amylopektin, β-Grenzdextrin sowie Maltotetraose und Maltose.

Für den Versuch wurde zunächst ein 1 l-Erlenmeyerkolben, gefüllt mit YET-Medium und 1 % Glucose, mit einer Stammkultur beimpft und als Vorkultur 16 h bei 30° Celsius in einem Reziprokschüttler bebrütet. Mit je 1 ml dieser Vorkultur wurden dann acht 1 l-Erlenmeyerkolben beimpft, die mit 50 ml YET-Medium gefüllt waren und eines der oben genannten Kohlenhydrate in einprozentiger Lösung enthielten. Die Kolben wurden bei 30°C bebrütet, und ab 16 Stunden wurde regelmässig in jedem Kolben die Amylase-Aktivität und die Zelldichte gemessen. Die maximale Amylase-Aktivität wurde in einem Balkendiagramm dargestellt.

2.2.11. Reinigung der Transferasen aus Pseudomonas stutzeri

Die Transferasen wurden aus dem gewaschenen und bei - 18 °C aufbewahrten Zellmaterial in sechs Reinigungsschritten isoliert. Nach jedem Reinigungsschritt wurden die Transferase-Aktivität und die Proteinkonzentration ermittelt und in Tabelle 3 zusammengefasst.

- Herstellung zellfreier Extrakte und Ammoniumsulfatfällung

60 g (Nassgewicht) gewaschener und aufgetauter Zellen wurden in 300 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) suspendiert und bei 4 °C zwei Minuten mit Ultraschall behandelt. Das Sonificat wurde 40 Minuten bei 48.000 xg (0 °C) zentrifugiert. Anschliessend wurden die Transferase-Aktivität und die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt.

Der Überstand (ca. 300 ml) wurde mit eiskaltem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Aus der verdünnten Lösung wurde mit fein gemahlenem Ammoniumsulfat bei 4 °C und 70 % Sättigung (44) das Protein gefällt. Der Niederschlag wurde fünf Minuten bei 48.000 xg (0 °C) abzentrifugiert und damit anschliessend die spezifische Transferase-Aktivität bestimmt.

- Chromatographie der Transferasen aus Ps. stutzeri an Sepharose 6 B

Nach der Fällung mit Ammoniumsulfat wurde eine chromatographische Trennung an Sepharose 6 B durchgeführt. Das Gel wurde nach Vorschrift des Herstellers (83) in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gequollen und gepackt. Die Säule (80 x 2,5 cm) wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und einer Fliessrate von 12 ml/h bei einer Säulentemperatur von 4 °C eluiert.

Eine entsprechende Menge des Niederschlags aus der Ammoniumsulfatfällung wurde in 7,0 ml Elutionspuffer gelöst. - Die Probe enthielt 40,3 mg Protein/6,3 U/mg Protein. Während der Chromatographie wurde das Eluat in Fraktionen von 3 ml unterteilt, wobei die Transmission im Durchfluss bei 280 nm gemessen wurde. Nach der Chromatographie wurde, wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, die Amylase-Aktivität sowie die Maltodextrin-Phosphorylase-Aktivität und die Transferase-Aktivität bestimmt. Die Fraktionen 75 bis 95 mit den höchsten Transferase-Aktivi-

täten wurden vereint und das Protein mit Ammoniumsulfat gefällt.

- Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-50

Vor dem Füllen der Säule wurde DEAE - Sephadex A-50 nach Angaben des Herstellers behandelt (84). Das Gelbett hatte eine Länge von 20 x 2,5 cm und wurde bei 4 °C Säulentemperatur mit 0,1 M Tris·HCl (pH 7,6) als Startpuffer eluiert. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 20 ml/h.

Als Probe wurde der Ammoniumsulfat-Niederschlag aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt in Startpuffer gelöst und mit einem Ultrafiltrationsgerät (Amicon Typ 202/ PM 10 Membran) solange dialysiert, bis keine Ammonium-Ionen mehr die Membran passierten (Nachweis mit Nesslers Reagenz). In der Probe von 4 ml wurde eine Proteinkonzentration von 24,7 mg/ml und eine spezifische Transferase-Aktivität von 40 U/mg Protein ermittelt.

Die Proteine wurden zunächst mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in 0,1 M Tris · HCl (pH 7,6) eluiert. Das Volumen des linearen Gradienten betrug 600 ml. Nach beendeter Gradientenelution wurde mit 0,5 M NaCl in 0,1 M Tris · HCl (pH 7,6) eluiert.

Während der Chromatographie wurde die Transmission bei 280 nm im Durchfluss gemessen und in den gesammelten Fraktionen von 4,3 ml die Maltodextrin-Phosphorylase- und die Transferase-Aktivität ermittelt. Die Fraktionen mit Transferase-Aktivität wurden vereint und durch Ultrafiltration (PM 10 - Membran) konzentriert. Aus dem Konzentrat wurde anschliessend das Protein mit Ammoniumsulfat gefällt.

- Chromatographie der Transferasen an Bio-Gel P-150

Bio-Gel P-150 wurde in 0,07 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gequollen. Anschliessend wurde die Säule wie bei FLODIN (45) gefüllt, bis eine Gelbettlänge von 110 x 1,5 cm erreicht war. Die Säulentemperatur betrug 8 °C.

Als Probe wurde gefälltes Enzym aus der Ionenaustauschchromatographie in 2,5 ml Elutionspuffer gelöst, wobei die Proteinkonzentration in der Probe 17,2 mg/ml und die spezifische Aktivität 48 U/mg Protein betrug. Die Säule wurde mit einer Fliessrate von 8 ml/h eluiert. Das Eluat wurde bei 280 nm im Durchfluss gemessen und in Fraktionen von 3 ml gesammelt, in denen die jeweilige Transferase-Aktivität ermittelt wurde.

Nach der Chromatographie wurden die Fraktionen 57 - 61 zur Fraktion A vereint und durch Ultrafiltration konzentriert, während die Fraktionen 68 - 73 als Fraktion B gesammelt und konzentriert wurden. Beide Fraktionen wurden anschliessend an Hydroxylapatit chromatographiert.

- Chromatographie der Fraktionen A und B an Hydroxylapatit

Die Chromatographie beider Fraktionen an Hydroxylapatit wurde, wie in Kapitel 2.2.9 für die Reinigung der Amylase beschrieben, durchgeführt.
Zur Gradienten-Elution wurde lediglich ein anderer Gradientenpuffer (0,2 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,8) gewählt.

Das Probevolumen der Fraktion A betrug 1,5 ml, wobei die Proteinkonzentration 15 mg/ml Probe und die spezifische Aktivität 189 U/mg Protein betrug. Das Protein der Fraktion B war mit einer Konzentration von 10,5 mg Protein/ml in einem Probevolumen von 2,0 ml gelöst. Die spezifische Aktivität betrug 275 U/mg Protein.

Im Verlauf der weiteren Untersuchungen wurde die Fraktion A als D-Enzym charakterisiert, während die Fraktion B durch ihre Wirkungsmuster als Amylomaltase identifiziert wurde. Mit den durch HA-Chromatographie gereinigten Transferasepräparaten wurden alle weiteren Versuche durchgeführt.

2.2.12. Methoden zur Charakterisierung der gereinigten Transferasen aus Ps. stutzeri

- Bestimmung des Molekulargewichts der Transferasen mit der diskontinuierlichen SDS-PAGE

Für die Molekulargewichtsbestimmung von Amylomaltase und D-Enzym wurde das gleiche diskontinuierliche Gelsystem nach LAEMMLI (76) wie für die Amylase benutzt.

Das Trenngel enthielt für diese Bestimmung 12,5% Acrylamid. Alle weiteren Bedingungen waren wie im Kapitel 2.2.10.

- Molekulargewichtsbestimmung durch Chromatographie an Sephadex G-200

Neben der Bestimmung des Molekulargewichts der Untereinheiten mit Hilfe der SDS-PAGE wurde das Molekulargewicht der Transferasen darüber hinaus durch Gelchromatographie an Sephadex G-200 bestimmt (85, 86). Die mit Sephadex G-200 gefüllte Säule hatte eine Gelbettlänge von 81 x 2,5 cm und wurde bei einer Säulentemperatur von 6°C mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) eluiert. Die Fliessrate betrug 18 ml/h.

Die Säule wurde mit folgenden Proteinen geeicht:
1) Cytochrom C (M.G.: 11.700) 2) Myoglobin (M.G.: 17.200)
3) Chymotrypsinogen A (M.G.: 25.700) 4) Ovalbumin (M.G.: 43.000)
5) BSA (M.G.: 68.000) 6) Aldolase (M.G.: 160.000)
7) Catalase (M.G.: 240.000).

Die Eichproteine wurden nacheinander auf die Säule gegeben, wobei das Eluat vom Beginn der Probeaufgabe bis zur Elution des Proteins mit einem Fraktionensammler aufgefangen wurde. Während der Chromatographie wurde die UV-Absorption des Eluats gemessen und mit einem Punktschreiber registriert. Das resultierende Chromatogramm gestattete es, die Anzahl der Fraktionen vom Beginn der Probeaufgabe bis zur Spitze des Proteinpeaks zu ermitteln. Anschliessend wurde das Elutionsvolumen (V_e) durch Abwägen bestimmt. Das äussere Volumen (V_o) der Säule wurde durch Chromatographie von Dextran 2000 gemessen.

Nach der Eichung der Säule wurde das Elutionsvolumen der beiden Transferasen bestimmt. Mit Hilfe einer Eichkurve konnte dann das Molekulargewicht aus dem Quotienten V_e/V_o ermittelt werden.

- Inkubation der Transferasen mit Maltodextrinen

Zur Darstellung der Syntheseprodukte der gereinigten Transferasen wurden 2%ige Lösungen von G 2, G 3, G 4, G 5 und G 6 mit entsprechenden Mengen Enzym in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,6) 30 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Hitzeinaktivierung (3 Minuten bei 90°C) unterbrochen. Die Lösungen wurden zentrifugiert und gelchromatographisch an Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm) untersucht.

Um die Wirkungsmuster der Transferasen mit anderen Glycosyltransferasen vergleichen zu können, wurde eine 2%ige Maltotetraoselösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,8) 24 Stunden bei 30°C mit Amylomaltase aus E. coli ML 30 inkubiert, die, wie in Kapitel 2.1.5. beschrieben, gereinigt wurde. Die enzymatischen Syntheseprodukte wurden ebenfalls gelchromatographisch untersucht.

- Kinetische Messungen

Zur Ermittlung der Temperaturoptima der Transferasen wurden mit dem D-Enzym 15 mM Maltose und mit der Amylomaltase 15 mM Maltotetraose in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,6) bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten, die Aktivität im Testansatz für das D-Enzym 24 U und für die Amylomaltase 12 U. Die Aktivitäten wurden, wie in Kapitel 2.2.4. beschrieben, nach der Hitzeinaktivierung durch Messung der freigesetzten Glucose ermittelt und als relative Transferase-Aktivität gegen die Temperatur aufgetragen.

Um das pH-Optimum für die Transferasen messen zu können, wurden für die Inkubationen mit D-Enzym 15 mM Maltose in 0,1 M Phosphatpuffer von pH 6,8 bis pH 9,0 gelöst. Entsprechend wurde als Substrat für die Amylomaltase 15 mM Maltotetraose in 0,1 M Phosphatpuffer von pH 6,0 bis 9,0 verwendet. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Alle sonstigen Bedingungen waren die gleichen wie bei der Bestimmung der Temperaturoptima.

Bei der Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit V als Funktion der Substratkonzentration S wurde wie folgt verfahren: Die Transferasen wurden bei 30°C mit verschiedenen Substratkonzentrationen von G 2, G 3 und G 4 in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,6) 30 Minuten inkubiert. Nach Abbruch der Inkubationen durch Hitzeinaktivierung (3 Minuten bei 90°C) wurde die aus den Oligosacchariden freigesetzte Glucose mit der Hexokinase-Methode gemessen. Die Aktivität im Inkubationsansatz war bei dem D-Enzym 6,2 U, während sie bei der Amylomaltase 8,0 U betrug. Die ermittelten Werte wurden in einem V/S-Diagramm dargestellt (82).

Der Km-Wert des D-Enzyms wurde mit Maltose als Substrat nach LINEWEAVER - BURK (80) bestimmt, während bei der Amylomaltase Maltotetraose als Substrat verwendet wurde.

Zur Ermittlung des Einflusses von Metall-Ionen, Thiol-Reagenzien und verschiedenen Kohlenhydraten auf die Aktivität der Transferasen wurde nach Vorinkubation der Enzyme (15 Minuten) mit dem jeweiligen Zusatz der Enzymtest durch Zugabe einer entsprechenden Substratmenge gestartet. Die Inkubation erfolgte bei dem D-Enzym bei 30 °C in 0,1 M Triäthanolamin (pH 7,6) mit 15 mM Maltose als Substrat, während die Amylomaltase mit 15 mM Maltotetraose als Substrat in 0,1 M Tris · HCl (pH 7,6) bei 30 °C inkubiert wurde.

- Nachweis der α-1,4-glycosidischen Bindungen

Zunächst wurden je 20 mg Maltotetraose in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,6) gelöst und anschliessend mit einer entsprechenden Menge D-Enzym oder Amylomaltase 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Kochen unterbrochen. Die Syntheseprodukte wurden in beiden Inkubationsansätzen mit je 50 Einheiten β-Amylase aus Süsskartoffeln in 0,1 M Acetatpuffer (pH 4,8) bei 60 °C über Nacht inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 100 °C unterbrochen.

Nach der Inkubation wurden sämtliche Lösungen zentrifugiert und gelchromatographisch an Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm) untersucht. Ausserdem wurden die aus der Inkubation mit β-Amylase entstandenen Abbauprodukte gaschromatographisch identifiziert (87).

Die Maltodextrinlösungen, die aus Maltotetraose durch die Wirkung der Transferasen entstanden sind, wurden gefriergetrocknet und zusammen mit Dextran 2000 und Ribose auf die Bio-Gel P-2-Säule (200 x 1,5 cm) gegeben. Die Proben bestanden aus 70 μl einer zweiprozentigen Lösung. Aus den Retentionszeiten und der bekannten konstanten Durchflussgeschwindigkeit (Milton-Roy-Pumpe) wurden die Elutionsvolumina (V_e) von den Maltodextrinen, Dextran 2000 und Ribose bestimmt. Anschliessend wurden wie bei HJERTEN (88) und DELLWEG, JOHN und TRENEL (89) die entsprechenden Verteilungskoeffizienten (K_d) ermittelt (vgl. 2.2.10. - Chromatographie der Amylase an Sepharose 6 B - CL in Gegenwart von 6 M Gu · HCl). Das äussere Volumen (V_o) ist das Elutionsvolumen von Dextran 2000, während das innere Volumen (V_i) durch Chromatographie von Ribose (M.G.: 150) bestimmt wurde.

Der negative Logarithmus der entsprechenden Verteilungskoeffizienten wurde dann gegen das Molekulargewicht der Maltodextrine aufgetragen (88, 89).

- Induktion der Transferasen mit Maltose und Maltotetraose

Pseudomonas stutzeri wurde in einem Glycerin-Minimal-Medium mit folgender Zusammensetzung kultiviert:

Lösung 1: 25 g Glycerin ad 500 ml dest. Wasser;

Lösung 2: 2,5 g $MgSO_4$ 7 H_2O ad 100 ml dest. Wasser;

Lösung 3: 0,2 g $CaCl_2$ 2 H_2O ad 100 ml dest. Wasser;

Lösung 4: 750 ml dest. Wasser;

Lösung 5: 35 g Na_2HPO_4 2 H_2O + 15 g KH_2PO_4 + 2,5 g NaCl
+ 5 g NH_4Cl ad 500 ml dest. Wasser.

Die hergestellten Lösungen wurden einzeln 20 Minuten bei 1 atü autoklaviert und nach dem Abkühlen in folgender Reihenfolge gemischt: 750 ml Lösung 4, 100 ml Lösung 1, 100 ml Lösung 5, 10 ml Lösung 2 und 10 ml Lösung 3.

Das Medium wurde auf zwei 5-Liter-Erlenmeyerkolben verteilt und nach der Zugabe von Pseudomonas-Zellen 25 Stunden bei 30°C geschüttelt, bis sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden.

Von diesem Zeitpunkt an wurden stündlich Proben genommen. Zu jeder Probenahme wurden 50 ml der log-Kultur abpipettiert und die darin enthaltenen Zellen fünf Minuten bei 48.000 xg (0°C) abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit ca. 20 ml kaltem 0,07 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt, und anschliessend wurden die Zellen in 4 ml 0,07 M Phosphatpuffer (pH 7,0) suspendiert und etwa 2 Minuten mit Ultraschall aufgeschlossen. Aus dem Zellextrakt wurden dann die Transferase-Aktivität und die Proteinkonzentration nach Folin bestimmt.

Die Induktorzugabe erfolgte nach der zweiten Probenahme. In den Kolben Nr. 1 wurde der Induktor Maltotetraose mit einer Konzentration im Medium von $2 \cdot 10^{-3}$ M gegeben, während in den Kolben Nr. 2 neben der gleichen Menge Maltotetraose noch $2 \cdot 10^{-3}$ M Glucose hinzugegeben wurde.

Der Versuch wurde mit $2 \cdot 10^{-3}$ M Maltose als Induktor wiederholt. Auf einen Glucose-Zusatz wurde verzichtet.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Induktion der Amylase durch verschiedene Kohlenhydrate

Pseudomonas stutzeri wurde im Fermenter in einem Medium mit 1 % löslicher Stärke kultiviert. Während des Wachstums wurde die Ausscheidung der Amylase mit Hilfe des PHADEBAS ® - Amylase - Tests gemessen. Die Amylase-Ausscheidung begann erst am Ende der logarithmischen Phase des Wachstums und erreichte am Anfang der stationären Phase ein Maximum (6, 16).

Während der Fermentationen wurde beobachtet, dass höhere Konzentrationen (2 ml) des Antischaummittels Polypropylenglykol im Fermentationsansatz die Amylasebildung begünstigen. Dieses Phänomen wurde bereits von anderen Autoren mit Polyäthylenglykol festgestellt (90).

Wie viele andere Amylasen (90 - 95) ist die Amylase aus Pseudomonas stutzeri ein induzierbares Enzym (6, 16), das zu seiner Bildung die Anwesenheit eines Induktors, wie zum Beispiel Stärke oder deren Abbauprodukte, im Medium benötigt. Um das Induktions-

Abb. 3: Induktion der Amylase durch Kohlenhydrate verschiedener Molekülgrösse

vermögen verschiedener Substrate für die Fermentation zu testen, wurden Schüttelkulturen mit verschiedenen Kohlenhydraten angesetzt und deren maximale Amylase-Ausscheidung verfolgt.

Die Abbildung 3 zeigt den Einfluss von Induktoren unterschiedlicher Molekülgrösse auf die Amylase-Ausscheidung. Aus dem Diagramm ist deutlich zu erkennen, dass grössere Moleküle eine hohe Amylase-Ausscheidung bewirken, während die kleinen Moleküle eine entsprechend geringere Amylasebildung induzieren. Die Enzymbildung wird also durch dieGrösse des Induktormoleküls beeinflusst, was bei der Fermentation berücksichtigt wurde.

Eine Zugabe von Glucose in das Medium hemmt die Bildung der Amylase.

3.2. Reinigung der Amylase

Die Amylase wurde in fünf Schritten 246-fach gereinigt. Die verschiedenen Reinigungsschritte mit den ermittelten spezifischen Aktivitäten wurden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Reinigungsschema für die extrazelluläre Amylase aus Pseudomonas stutzeri

Reinigungsschritt	Amylase-Aktivität U/ml	Protein mg/ml	Spezif. Amylase-Aktivität U/mg Protein	Reinigungsfaktor
1) Kulturüberstand nach Entfernung d. Bakterienzellen	3,5	4,1	0,85	1,0
2) 2,5fache Konzentration durch Gefriertrocknung u. Entfernung d. Schleims bei 40.000 xg	7,5	9,7	0,77	0,9
3) Fällung mit Ammoniumsulfat (45% Sättigung)	75	6,3	12	14
4) Affinitätschromatographie an Sephadex G-100	23,4	0,12	195	229
5) Chromatographie an Hydroxylapatit	18,8	0,09	209	246

Während des Wachstums scheidet Pseudomonas ein Polysaccharid als Schleim aus, das aus Glucose, Mannose und Rhamnose besteht (64). Da dieser Schleim die Reinigung der Amylase stört, musste er entfernt werden. Dieses gelang relativ einfach durch Konzentrierung des Mediums in der Kälte (Gefriertrocknung), wodurch der Schleim ausgeschieden wurde und abzentrifugiert werden konnte. Danach konnte das Protein durch Zugabe von Ammoniumsulfat (45 % Sättigung) gefällt werden.

Als nächster Reinigungsschritt schloss sich eine Affinitätschromatographie mit Sephadex G-100 als Adsorbens an.

Es ist bekannt, dass Amylasen mit ihren Inhibitoren (96 - 98) oder Substraten (99 - 101) in Wechselwirkung treten und Komplexe bilden. Dies wurde bereits für affinitätschromatographische Trennungen von Amylasen ausgenutzt. Dabei kommt es während der Chromatographie zu einer Anlagerung der Amylasen an den betreffenden Inhibitor (102) oder an das Substrat (101), welche wiederum an eine Gelmatrix gekoppelt und somit unlöslich sind. Nachdem das Fremdprotein aus der Säule geflossen ist, kann dann die an die Gelmatrix gebundene Amylase mit gelöstem Substrat oder Inhibitor von der Säule eluiert werden.

In Anlehnung an diese bereits bekannten Verfahren wurde von uns für die Reinigung der Amylase aus Ps. stutzeri ein affinitätschromatographisches Verfahren mit Sephadex G-100 entwickelt (16, 17). Bei der Reinigung der Amylase wurde beobachtet, dass dieses Enzym von Dextrangel stark retardiert wurde. Im Verlauf der Untersuchungen (vgl. 3.14.4.) wurde festgestellt, dass Dextran ein Inhibitor für die Amylase ist. Aus diesem Grund lagert sich die Amylase an das Dextrangel. Durch Elution der gebundenen Amylase mit 1 % Stärke kann das Enzym von der Dextran-Matrix abgelöst werden.

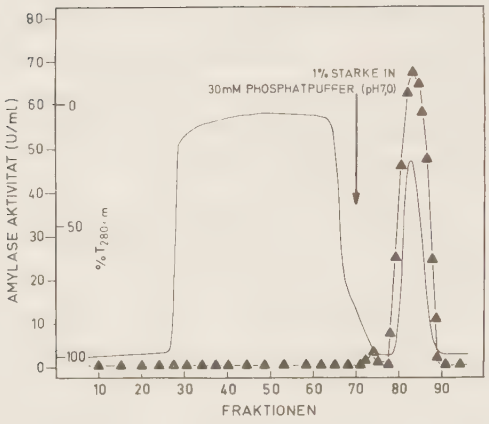

Abb.4.: Affinitätschromatographische Trennung der Amylase aus Ps.stutzeri an Sephadex G-100. Die Säule (8 x 2,5 cm Gelbett, 8 °C) wurde zunächst mit 30 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) eluiert, bis das nicht adsorbierte Protein von der Säule gewaschen war (gemessen durch die Transmission bei 280 nm, ——). Danach wurde die Amylase mit 1 % Stärke nach Zulkowsky in 30 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) eluiert. Fliessrate, 18 ml/h ; gesammelt wurden 3 ml pro Fraktion. Probe, 45 ml (51 mg Protein/ml; spezifische Aktivität, 12 U/mg Protein). Amylase-Aktivität (—▲—).

Die Abbildung 4 zeigt eine typische affinitätschromatographische Trennung an Sephadex G-100. Während sich die Amylase an den Inhibitor (Dextrangel-Matrix) bindet, wird das nicht adsorbierte Protein von der Säule eluiert. Anschließend kann das Enzym mit dem Ablösepuffer von der Säule eluiert werden. Durch diesen Reinigungsschritt wurde eine 229-fache Anreicherung erreicht.

Dieses Elutionsverhalten wurde nicht nur bei der Amylase aus Ps.stutzeri gefunden, sondern die Eigenschaft konnte ebenfalls bei den Endoamylasen aus A.oryzae (103), der α-Amylase aus Schweinepankreas (104) und der α-Amylase aus B.subtilis (16, 17) beobachtet werden, wenn auch weniger ausgeprägt als bei der Pseudomonas - Amylase (17). Die beiden Exoamylasen β-Amylase aus Süsskartoffeln und Glucoamylase aus A.niger zeigten nicht diese besondere Affinität zum Dextrangel.

Als letzter Reinigungsschritt schloss sich die Chromatographie mit Hydroxylapatit an. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde die Stärke als Hauptverunreinigung des Amylasepeaks aus der Affinitätschromatographie abgetrennt, da es nicht möglich war, die Stärke durch Ultrafiltration (Amicon/PM 10 Membran) zu entfernen. Der Amylase-Stärke- bzw. Maltodextrin-Komplex hätte bei der anschliessenden SDS-PAGE (vgl. 3.3.) das Vorliegen eines Glycoproteins vorgetäuscht (105), was sich durch eine geringere Wanderung infolge verminderter SDS-Bindung an das Protein ausgedrückt hätte.

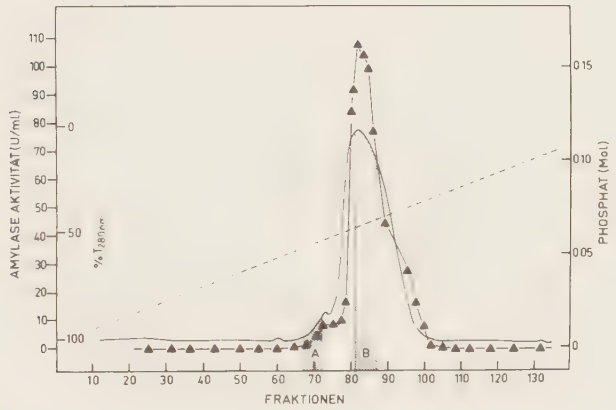

Abb. 5.: Chromatographie der Amylase an Hydroxylapatit. Das Enzym wurde mit einem linearen Natriumphosphatgradienten (5 bis 150 mM, pH 6,8) von der Säule eluiert (-----), wie bereits im experimentellen Teil beschrieben wurde. Transmission bei 280 nm (———); Amylaseaktivität (—▲—). Die Fraktionen unter den schraffierten Flächen wurden gesammelt und als Fraktion A und B elektrophoretisch analysiert. Weitere chromatographische Bedingungen: Gelbett (57 x 0,9 cm); Säulentemperatur, 8 °C; Fliessrate, 8 ml/h; gesammelt wurden 1,5 ml pro Fraktion. Probe, 2,0 ml (17,1 mg Protein/ml; spezifische Aktivität 195 U/mg Protein).

Das Elutionsdiagramm in Abbildung 5 zeigt, dass das Amylasepräparat nach der Affinitätschromatographie frei von Fremdprotein war. Daraus resultierte auch die verhältnismässig geringe Zunahme der spezifischen Aktivität nach der Hydroxylapatitchromatographie. Wie aus Abbildung 5 weiter zu ersehen ist, konnte die Amylase in zwei Fraktionen getrennt werden, die anschliessend mittels SDS-PAGE untersucht wurden.

3.3. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Um das Molekulargewicht der Untereinheiten der Amylase aus Pseudomonas stutzeri zu bestimmen, wurden die Fraktionen A und B nach der Chromatographie an Hydroxylapatit einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von 0,1 % SDS unterworfen. Es wurde ein 10 %iges Trenngel gewählt, welches bei einem Molekulargewicht der Protein-Untereinheiten von 10.000 bis 70.000 Daltons eine gute Trennung gewährleistet. Durch die Verwendung eines Sammelgels und des diskontinuierlichen Puffersystems nach LAEMMLI (76) konnten besonders scharfe Banden erhalten werden, wodurch das Molekulargewicht noch präziser bestimmt werden konnte.

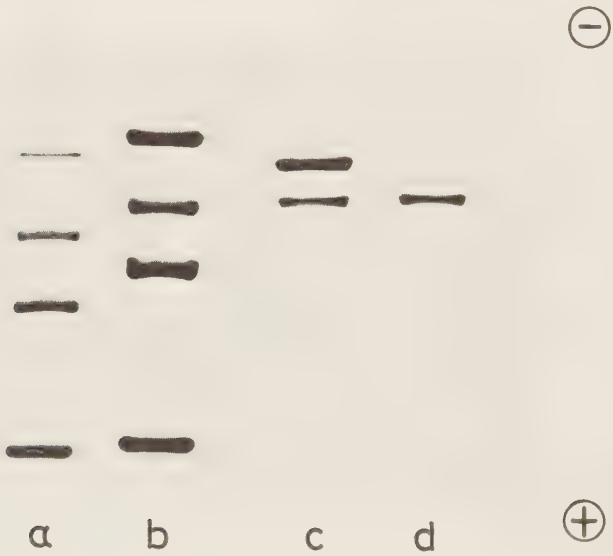

Abb. 6.: SDS-Elektrophorese der Untereinheiten verschiedener Eichproteine (Bahn a und b) und der Amylase aus Ps. stutzeri (Bahn c: Fraktion B; Bahn d: Fraktion A) in 10 %igem Trenngel, gefärbt mit Coomassiebrillantblau. Folgende Eichproteine wurden verwendet, wobei sich die Molekulargewichtsangaben auf die Untereinheiten beziehen: Bahn a (von oben nach unten): Katalase (58.000), Aldolase (40.000), Chymotrypsinogen A (25.700), Cytochrom c (11.700). Bahn b: BSA (68.000), Ovalbumin (43.000), LDH (36.000), Myoglobin (17.200).

Wie Abbildung 6 zeigt, besteht die auf der Bahn c elektrophorierte Fraktion B der Amylase (nach HA-Chromatographie) aus 2 Polypeptidketten, den Protomeren A und B, während die Fraktion A (Bahn d) nur aus dem Protomer B besteht.

Die Eichproteine aus Bahn a und b wurden vermessen und ihre relative Beweglichkeit gegen das Molekulargewicht, das aus der Literatur bekannt war, aufgetragen. Mit dieser Eichkurve, die in Abbildung 7 dargestellt ist, konnte aus der Beweglichkeit der beiden Untereinheiten A und B ihr Molekulargewicht bestimmt werden.

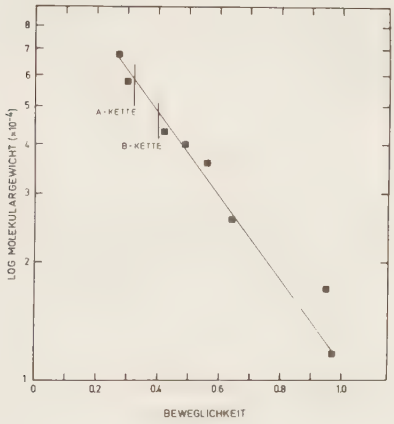

Abb. 7.: Halblogarithmische Darstellung des Molekulargewichts verschiedener Eichproteine (■) gegen die Beweglichkeit relativ zur Bromphenolblaufront nach diskontinuierlicher PAGE in 10%igem Gel in Gegenwart von 0,1% SDS. Die vertikalen Linien zeigen die ermittelten Werte der Polypeptidketten A und B der Amylase. Folgende Eichproteine wurden verwendet: BSA (68.000), Katalase (58.000), Ovalbumin (43.000), Aldolase (40.000), LDH (Muskel) (36.000), Chymotrypsinogen A (25.700), Myoglobin (17.200) und Cytochrom c (11.700).

Für die Polypeptidkette A ergab sich ein Molekulargewicht von 58.000 Daltons, während für die Polypeptidkette B ein Molekulargewicht von 48.000 Daltons ermittelt wurde.

Nicht nur die Amylase aus Pseudomonas stutzeri, sondern auch andere amylolytische Enzyme mit hohem Molekulargewicht setzen sich aus mehreren Polypeptidketten, d. h. aus Untereinheiten zusammen, wie zum Beispiel die α-Amylasen aus Schweinepankreas (106) und aus Bacillus subtilis (107, 108). Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass diese Amylasen als Isoenzyme vorliegen. Auch in der Amylase aus Hühnerpankreas wurden bereits Isoenzyme elektrophoretisch nachgewiesen (73).

ROBYT und ACKERMANN haben nach Polyacrylamidgel-Elektrophorese gefunden, dass sich die Amylase aus Pseudomonas stutzeri aus mindestens zwei Isoenzymen zusammensetzt (6), wobei sie allerdings nur eine Untereinheit gefunden haben. Durch Chromatographie an Bio-Gel P-150 ermittelten die Autoren für die Untereinheit der Amylase ein Molekulargewicht von 12.500 Daltons und stellten dabei fest, dass diese Untereinheit durch Aggregation sechs verschiedene Formen mit Molekulargewichten von 12.500 bis 125.000 Daltons bildet.

Für die Darstellung von Isoenzymen ist die Disk-PAGE von ORNSTEIN und DAVIES (68, 69) auf Grund ihres Auflösungsvermögens besonders gut geeignet. Da die Proteine nicht nur nach Molekülgrösse, sondern auch nach ihrer Ladung getrennt werden (109), erhält man ein genaues Bild über die Verteilung der Isoenzyme.

Die Amylase aus Pseudomonas stutzeri wurde an einem 10%igen Gel getrennt und anschliessend mit Coomassiebrillantblau gefärbt. Ausserdem wurde die Anwesenheit von Glycoproteinen im Gel mit Perjodsäure-Schiffs-Reagenz (71) und mit Alcianblau (72) überprüft, wobei es in beiden Fällen keine Farbreaktion gab. Daraus kann geschlossen werden, dass die Amylase aus Pseudomonas stutzeri kein Glycoprotein ist. -

Vor dem Färben mit Coomassiebrillantblau wurde zunächst die Amylase-Aktivität im Gel nachgewiesen, indem das Trenngel auf eine Kontaktfilm-Platte aus Polyacrylamidgel gelegt wurde, die 1% Amylose als Substrat enthielt. Nach entsprechender Inkubation in einer feuchten Kammer bei 30° C wurde die Substratplatte mit Jodlösung angefärbt und photographiert.

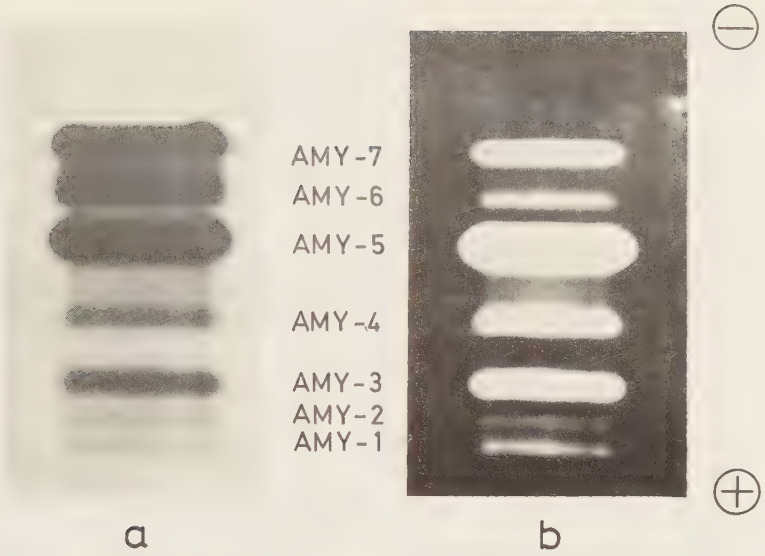

Abb. 8.: Isoenzyme der Amylase aus Ps. stutzeri nach PAGE in 10%igem Trenngel. Das Gel a wurde mit Coomassiebrillantblau angefärbt, nachdem vorher die Amylase-Aktivität im Gel mit einer Kontaktfilm-Platte, wie im experimentellen Teil beschrieben, nachgewiesen wurde. Gel b zeigt dieses Zymogramm nach Anfärbung mit 0,001 N Jod-Lösung.

Das Elektropherogramm der Amylase aus Pseudomonas stutzeri in Abbildung 8 zeigt, dass die beiden Untereinheiten A und B so aggregieren, dass sieben Isoenzyme gebildet werden. Aus der Abbildung ist weiterhin zu ersehen, dass für jede mit Coomassiebrillantblau angefärbte Proteinbande (Gel a) eine entsprechende Amylase-Aktivität auf dem Zymogramm (Gel b) nachgewiesen werden kann. Da neben den amylolytisch aktiven Banden keine andere Proteinbande nachgewiesen wurde, kann man daraus schliessen, dass die isolierte Amylase rein ist.

Das Zymogramm in Abbildung 8 wurde genau eine Stunde mit dem Trenngel inkubiert, und es zeigte sich nach der Entwicklung mit Jod-Lösung, dass die Proteinbanden eine unterschiedliche Affinität zur Amylose aufweisen, was man an der Intensität des Substratabbaus feststellen kann. So baut die Bande AMY-6 trotz ihrer hohen Proteinkonzentration verhältnismässig wenig Amylose ab, während die Banden AMY-3 und AMY-4 eine sehr hohe Affinität zur Amylose aufweisen. Entsprechend ihrer Zusammensetzung besitzen die Isoenzyme folglich eine unterschiedliche Affinität zur Amylose.

Auf Grund der geringen Beweglichkeit der Amylase in diesem 10%igen Gel kann man schliessen, dass dieses Enzym ein wesentlich höheres Molekulargewicht hat (109), als es von ROBYT und ACKERMAN angenommen wurde (6). Eine konzentrationsabhängige Verteilung der Isoenzyme, wie von ROBYT und ACKERMAN (6) beschrieben, wurde nicht gefunden.

Um Informationen über die Anzahl der Protomere in diesem oligomeren Amyloseprotein zu erhalten, wurde das native Protein mit Hilfe der Quervernetzungstechnik von DAVIES und STARK (78) untersucht. Bei dieser Methode werden die Protomere in den Oligomeren mit Dimethylsuberimidat quervernetzt und in Gegenwart von 0,1% SDS elektrophoriert.

Um das Molekulargewicht der quervernetzten Produkte ermitteln zu können, wurde das Gelsystem mit Ovalbumin, das vorher mit Hilfe von Dimethylsuberimidat intermolekular quervernetzt wurde, wie bei CARPENTER und HARRINGTON geeicht (77). Auf diese Weise ist es möglich, sich Eichproteine für SDS-Gelsysteme bis 250.000 Daltons und darüber hinaus herzustellen.

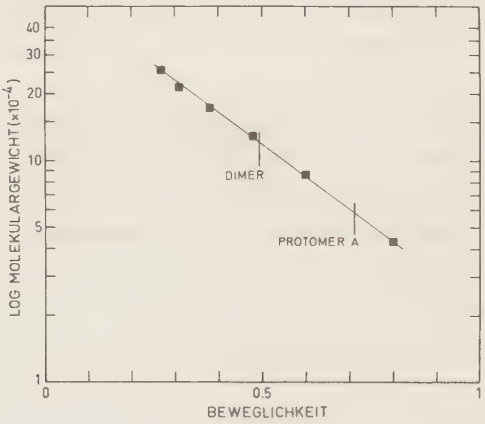

Abb. 9.: Halb-log-Darstellung des Molekulargewichts gegen die Beweglichkeit relativ zur Bromphenolblaufront für verschiedene Arten von quervernetztem Ovalbumin (■) nach Elektrophorese in 5%igem Gel bei pH 8,5 in Gegenwart von 0,1% SDS. Die vertikalen Linien zeigen die Beweglichkeit des Protomeren und des Dimeren, das durch Quervernetzung der Untereinheit A mit Dimethylsuberimidat entstanden ist.

In der Eichkurve (Abb.9) ist die relative Beweglichkeit der verschiedenen Arten von quervernetztem Ovalbumin nach SDS-PAGE gegen das Molekulargewicht dargestellt. Die vertikale Linie zeigt die Beweglichkeit des Protomeren A, dem auch in diesem System ein Molekulargewicht von 58.000 Daltons zugeordnet werden kann. Auf die Darstellung des Protomeren B wurde verzichtet, da die Proteinbande nur schwach sichtbar war, was bedeutet, dass in dieser Probe das Protomer A dominierte.
Eine weitere vertikale Linie deutet die Beweglichkeit einer Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 120.000 Daltons an. Es handelt sich hierbei um ein Dimer, das vermutlich durch Quervernetzung von zwei Protomeren A entstanden ist.
Da keine höheren Aggregate unter diesen Versuchsbedingungen beobachtet werden konnten, lässt dieses Ergebnis die Vermutung zu, dass das Dimer eine wichtige Einheit für die Struktur der Amylase darstellt. Auch von ROBYT und ACKERMAN wurde durch Gelchromatographie festgestellt, dass durch Aggregation von Dimeren oligomere Proteine bis zu den Decameren gebildet werden (6).

Um aber aus zwei verschiedenen Untereinheiten sieben Isoenzyme darstellen zu können, müsste eine hexamere Struktur der Amylase vorliegen, was sich aber durch den Versuch nicht beweisen liess. Nimmt man jedoch an, dass sich drei Dimere zu einem hexameren Amylasemolekül zusammenschliessen, so ergeben sich durch Kombination von A- und B-Untereinheiten folgende sieben Isoenzyme :

$$A_6 , A_5B , A_4B_2 , A_3B_3 , A_2B_4 , AB_5 , B_6$$

Für diese Annahme spricht die Tatsache, dass bei der Chromatographie an Hydroxylapatit (Abb.5) die Fraktion A ausschliesslich aus B-Untereinheiten zusammengesetzt war (Abb.6), während der Hauptpeak die hybriden Formen enthielt, die sich aus den Untereinheiten A und B zusammensetzten.

3.4. Chromatographie an Sepharose 6B-CL in Gegenwart von 6 M Gu · HCl

Eine weitere sehr genaue Methode, um das Molekulargewicht von einzelnen Polypeptidketten zu bestimmen, ist die Gelchromatographie der Untereinheiten in Gegenwart von 6 M Gu · HCl, wie sie von FISH, MANN und TANFORD beschrieben wurde (79,110). Diese Methode wurde gewählt, um das mit der SDS-PAGE ermittelte Molekulargewicht weiter abzusichern. Die Säule wurde mit verschiedenen Proteinen geeicht, die vorher reduziert und mit Jodessigsäure alkyliert wurden.

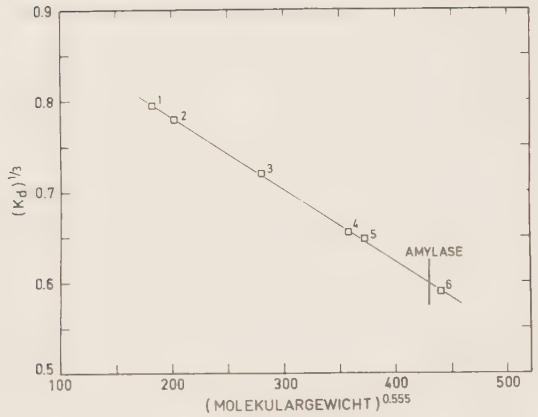

Abb.10.: Molekulargewichtsbestimmung der Amylase aus Ps. stutzeri an Sepharose 6B-CL in Gegenwart von 6 M Gu · HCl. Darstellung der experimentell ermittelten Verteilungskoeffizienten $(K_d)^{1/3}$ gegen das Molekulargewicht der Eichproteine. Dabei wird $(K_d)^{1/3}$ gegen das (Mol.-Gew.)^{0,555} aufgetragen. Die vertikale Linie zeigt den ermittelten Wert für die Amylase aus Ps. stutzeri. Folgende Eichproteine (□) wurden verwendet: 1.: Cytochrom (M.G.: 11.700); 2.: Lysozym (14.300); 3.: Chymotrypsinogen A (25.700); 4.: Aldolase (40.000); 5.: Ovalbumin (43.000); 6.: Catalase (58.000); Chromatographische Bedingungen: Gelbett, 78 x 1,5 cm; Säulentemperatur, 20 °C; Elutionspuffer, 6 M Gu · HCl in 50 mM Acetatpuffer pH 5,5; Fliessrate, 4 ml/cm^2/h; gesammelt wurden 1,5 ml pro Fraktion. Probe, jeweils 500 µl (5 mg Protein in der Probe).

Die Abbildung 10 zeigt die graphische Darstellung der Kubikwurzel aus dem Verteilungskoeffizienten K_d gegen das Molekulargewicht^{0,555} für verschiedene Eichproteine. Für die Amylase aus Pseudomonas stutzeri wurde $(K_d)^{1/3} = 0,6$ gemessen, was einem Molekulargewicht von 55.000 Daltons entspricht.

Da das Auflösungsvermögen der Sepharose 6 B - Säule nicht annähernd so gut wie bei der SDS-PAGE ist, konnten die beiden Untereinheiten an der Säule nicht getrennt werden. Es wurde daher der Mittelwert aus den beiden Molekulargewichten bestimmt, der nach den Werten aus der SDS-PAGE bei 53.000 Daltons liegen muss. Eine Abweichung von 2.000 Daltons liegt aber durchaus im Fehlerbereich der Methode, der mit 7% angegeben wurde (110).

3.5. Abbau von Stärke durch die Amylase

Bei der Einwirkung des an Hydroxylapatit gereinigten Enzyms auf Stärke konnte zunächst kein anderes Abbauprodukt als Maltotetraose festgestellt werden, wie Abbildung 11 zeigt. Die im oberen Teil der Abbildung dargestellte Zeit-Umsatzkurve wird nach kurzem linearen Anstieg immer flacher, weil das Endprodukt Maltotetraose die Amylase hemmt.

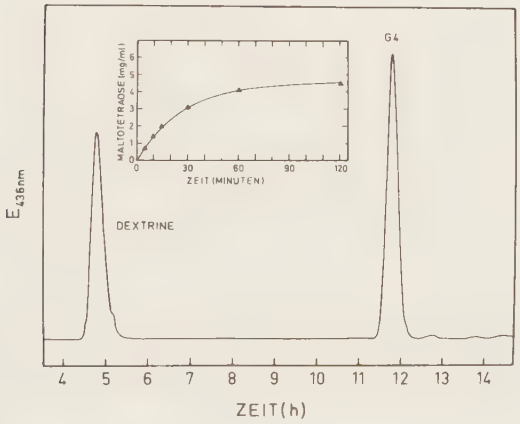

Abb. 11.: Gelchromatographie des Abbaus von Stärke durch die Amylase aus Ps. stutzeri an Bio-Gel P-2 mit einer Zeit-Umsatzkurve von Stärke mit der Maltotetraose-bildenden Amylase. Der Gehalt an Maltotetraose (G 4) im Inkubationsansatz wurde gelchromatographisch gemessen (Bio-Gel P-2). Andere Abbauprodukte als G 4 waren nicht messbar. Bedingungen für den Stärkeabbau: 80 mg Stärke nach Zulkowsky in 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) wurden mit 1,2 U Amylase 120 Minuten bei 37 °C inkubiert. Probe, 90 µl dieses Inkubationsansatzes. Sonstige chromatographische Bedingungen: Bio-Gel P-2, minus 400 mesh; Gelbettlänge, 200 x 1,5 cm; Säulentemperatur, 65 °C; es wurde mit Wasser und einer Fliessrate von 25 ml/h eluiert.

Dieser Abbau lässt nach allen bisherigen Kenntnissen sich als ein reiner Exomechanismus deuten, da ausschliesslich G 4 als Produkt gebildet wird. Inkubiert man die

Stärke jedoch mit höheren Enzymkonzentrationen über einen längeren Zeitraum, findet man neben Maltotetraose noch G 3, G 2 und G 1. Dieser Endabbau ist in Abbildung 12 dargestellt.

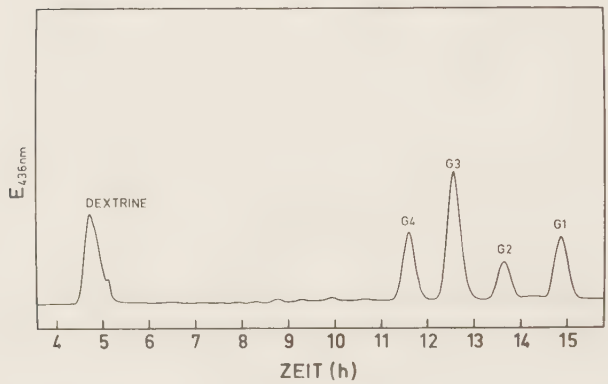

Abb. 12.: Chromatographie des Endabbaus einer 1%igen Stärkelösung mit der Amylase aus Pseudomonas an Bio-Gel P-2 Inkubationsbedingungen: 20 mg Stärke nach Zulkowsky in 2,0 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0); Aktivität der Amylase, 3,7 U/10 mg Stärke bei 37 °C, Inkubationszeit 24 h. Probe, 90 µl einer 1%igen Lösung. Alle übrigen Bedingungen waren wie in Abb. 11.

Es ist bekannt, dass die Stärke durch eine Exoamylase, wie zum Beispiel β-Amylase, bis zu etwa 60 Prozent abgebaut werden kann (111). Bei dem Endabbau von Stärke durch die Amylase aus Ps. stutzeri wird die Stärke jedoch weiter abgebaut, als dies durch einen reinen Exomechanismus zu erhalten ist. Die Stärke wird bei der Pseudomonas-Amylase zu 75 Prozent hydrolysiert, was auf einen Endomechanismus des Stärkeabbaus hindeutet.

Wie bereits beschrieben (18, 19, 20, 46, 47), können reine Exoamylasen keine quervernetzte blaugefärbte Stärke abbauen, da die Vernetzerbrücken und die mit Farbstoff markierten Glucosereste von diesen Enzymen nicht übersprungen werden können. Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass die Amylase aus Ps. stutzeri

quervernetzte Blaustärke angreift, obwohl es nach den Ergebnissen von ROBYT und ACKERMAN die Stärke ausschliesslich durch einen Exomechanismus hydrolysiert (6). Diese Tatsache wurde für einen Aktivitätstest ausgenutzt (vgl. 2.2.2.).

Nach diesen Ergebnissen könnte das Enzym in der Lage sein, die Stärke auch endogen zu spalten.

3.6. Pullulanolyse durch Amylasen

Um diesen Endomechanismus bei der Amylase aus Ps. stutzeri nachzuweisen, wurde folgende Methode entwickelt.

Seit den Untersuchungen von CATLEY et al. (42, 112, 113) ist bekannt, dass Pullulan nicht nur eine α-1,6-glycosidisch verknüpfte Polymaltotriose ist, sondern dass in diesem Polysaccharid ausserdem noch Maltotetraose-Einheiten vorkommen, von denen der grösste Teil endogen vorliegt. Diese G 4 - Einheiten im Innern des Moleküls können durch Endoamylasen gespalten werden (42, 113), so dass das Makromolekül rasch in kleinere Fragmente zerfällt. Dieser Abbau des Pullulans wurde mit der Amylase aus Pseudomonas stutzeri und zum Vergleich mit der α-Amylase aus Bacillus subtilis durchgeführt. Die Abbauprodukte wurden an Bio-Gel P-2 chromatographiert.

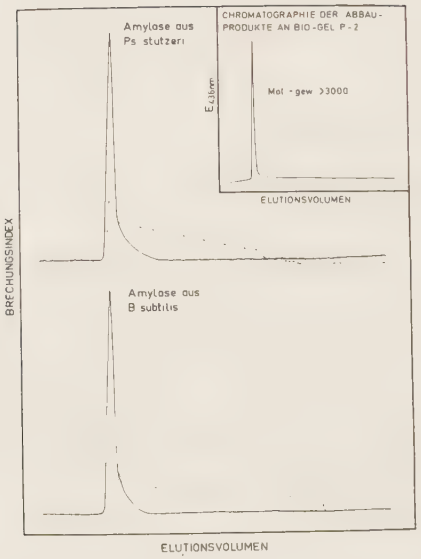

Abb. 13.: Gelchromatographie des Abbaus von Pullulan durch Amylase aus Ps. stutzeri und B. subtilis an Bio-Gel P-100; Säule, 2,5 x 34 cm; Säulentemperatur, 45° C; Elutionsmittel, Wasser; Fliessrate, 2,5 ml/h. Als Detektor wurde ein Differentialrefraktometer (Knauer Typ 2025/50) verwendet. Probe, 8 mg Pullulan (Pullulanhydrolysat); Empfindlichkeit, x 8. Die unterbrochene Linie zeigt das Elutionsprofil des Pullulanhydrolysats, die durchgezogene Linie das Pullulan vor dem Abbau durch Amylasen. Der Pullulanabbau mit Ps. stutzeri-Amylase wurde zusätzlich an Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm) chromatographiert (Abb. oben rechts).

Wie die Abbildung 13 zeigt, wurde das Pullulan von beiden Amylasen hydrolysiert. Dabei haben die Abbauprodukte der B. subtilis-Amylase ein geringeres Molekulargewicht als die Hydrolyseprodukte aus der Inkubation mit der Amylase aus Ps. stutzeri, wie es aus den unterschiedlichen Elutionsvolumina leicht zu erkennen ist. Die Abbaufragmente der Pullulanolyse durch die Pseudomonas-Amylase wurden an einer Bio-Gel P-2-Säule (200 x 1,5 cm) chromatographiert, welche Moleküle mit einem höheren

Molekulargewicht als 3.000 Daltons ausschließt. Wie in Abbildung 13 oben rechts zu erkennen ist, werden die Hydrolyseprodukte aus der Inkubation mit der Pseudomonas-Amylase an Bio-Gel P-2 ausgeschlossen.

Die Tatsache, dass die Amylase aus Pseudomonas stutzeri in der Lage ist, Pullulan abzubauen, ist ein Hinweis dafür, dass das Enzym α-Glucane endogen spaltet.

Das Pullulan, welches für diese Untersuchungen verwendet wurde, enthält 5% Maltotetraose. Um dieses zu ermitteln, wurde das Pullulan vollständig mit Pullulanase aus Aerobacter aerogenes abgebaut. Das Hydrolysat wurde an Bio-Gel P-2 chromatographiert und anschliessend die Anteile der Kohlenhydrate durch Vermessen der Peakhöhe ermittelt. Das entsprechende Chromatogramm ist in der Abbildung 14 A dargestellt.

Der untere Teil der Abbildung 14 zeigt das Gelchromatogramm des Pullulans nach Hydrolyse durch Amylase aus Pseudomonas stutzeri und anschliessendem Abbau der α-1,6-glykosidischen Bindungen durch Pullulanase.
Die Maltotetraose, die im Inneren des Moleküls enthalten ist, kann in zwei Moleküle Maltose gespalten werden, wie der Peak G 2 andeutet. Darüber hinaus ist die Amylase offensichtlich in der Lage, die Maltotetraose-Einheit auch in unmittelbarer Nachbarschaft einer α-1,6-glykosidischen Bindung zu hydrolysieren (Abb. 15).

Abb.14.: Enzymatische Hydrolyse von Pullulan und Chromatographie der Hydrolysate an Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm). Chromatogramm A: Abbau des Pullulans durch Pullulanase. Es wurden 95 % G 3 und 5 % G 4 gebildet. Bedingungen : Inkubation von 1 % Pullulan (10 mg/ml) mit 7,5 U Pullulanase in 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,0) bei 37 °C und 10 h. Probe, 60 µl dieses Ansatzes. Chromatogramm B :Pullulanolyse mit Ps.stutzeri - Amylase und weiteren Abbau des Ansatzes durch Pullulanase. Bedingungen : 2,5 ml 1 %ige Pullulan-Lösung wurden bei 37 °C und pH 7,0 mit Amylase 18 h inkubiert. Anschliessend Inkubation mit 15 U Pullulanase 24 h bei 37 °C und pH 5,0. Probevolumen, 70 µl dieses Ansatzes.

Die Pullulanase aus A.aerogenes kann nur dann spalten, wenn neben der α-1,6-glykosidischen Bindung mindestens eine α-1,4-glykosidische Bindung vorhanden ist (114,115). Aus diesem Grund entstehen "verzweigte (branched) Tetrasaccharide", die als die Peaks B4 in der Abbildung 14B gekennzeichnet sind und entweder Glucosylmaltotriose oder Maltotriosylglucose darstellen.

Wie das anschliessende Schema in Abbildung 15 zeigt, können beide Formen möglicherweise auch zusammen vorkommen. Das Pentasaccharid B 5 (Abb. 14) kann nicht durch die bislang bekannte Struktur des Pullulans erklärt werden, könnte aber dadurch entstanden sein, dass zwei Maltotetraose-Einheiten in unmittelbarer Nachbarschaft vorkommen und nur durch eine Maltotriose-Einheit getrennt werden.

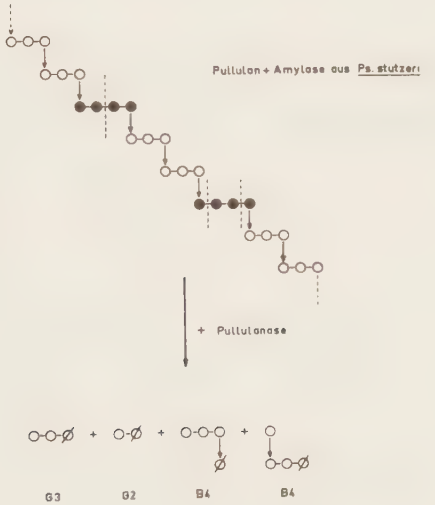

Abb. 15.: Hydrolyse der Maltotetraose-Einheiten im Pullulan durch die Amylase aus Ps. stutzeri und anschliessender Spaltung der α-1,6-Bindungen mit Pullulanase. α-1,6-Bindungen ↓ ; α-1,4-Bindungen —; nicht reduzierende Glucosyleinheiten O ; reduzierende Einheiten Ø ; Bindungen, die von der Amylase gespalten werden können —|—.

3.7. Kinetische Messungen

pH- und Temperaturoptimum der Amylase aus Ps. stutzeri sind bereits beschrieben worden (6, 16). Nach ROBYT und ACKERMAN beträgt das Temperaturoptimum 47 °C. Diese Temperatur ist jedoch bei langen Inkubationszeiten nicht zu empfehlen, da die Amylase denaturiert werden kann (6). Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei einem pH-Wert von 7,5 (16) und zeigt als einzige bekannte Amylase eine beträchtliche Aktivität bei pH 10,0 (116).

Zur Unterscheidung kompetitiver und nicht kompetitiver Hemmung der Amylase durch verschiedene Dextrankonzentrationen wurde der K_m-Wert der Amylase nach LINEWEAVER-BURK bestimmt (80).

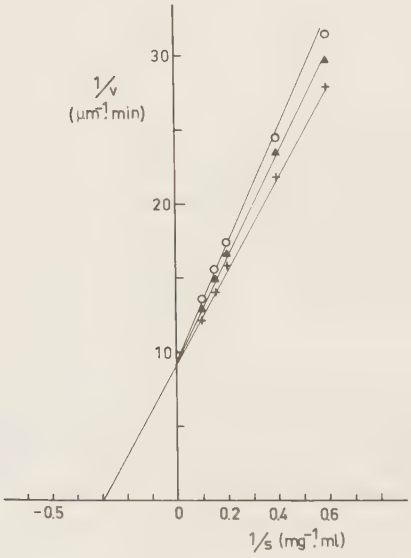

Abb. 16.: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Ermittlung des K_m-Wertes der Amylase aus Ps. stutzeri bei Verwendung von Stärke als Substrat und mit verschiedenen Konzentrationen von Dextran. (— + —) Stärke ohne Dextran; (—▲—) mit 0,25 mg Dextran pro ml; (—○—) mit 2,5 mg Dextran pro ml.

Wie aus Abbildung 16 zu ersehen ist, wird der K_m-Wert bei Anwesenheit von Dextran grösser, was eine höhere Konzentration des Substrats erforderlich macht, um die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) unverändert bleibt und lediglich die Michaelis-Konstante des Substrates (K_m) grösser wird, liegt eine kompetitive Hemmung durch das Dextran vor.

Eine andere Darstellung der Hemmung durch Dextran zeigt Abbildung 17.

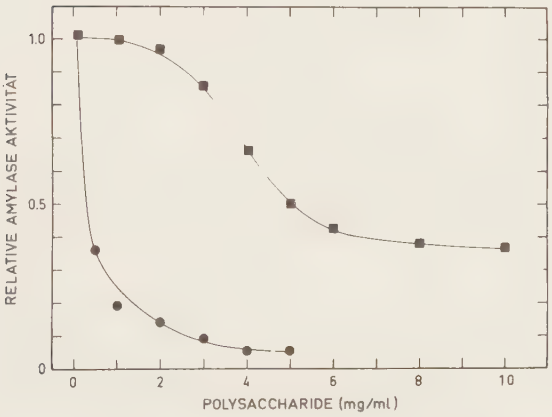

Abb. 17.: Hemmung der Amylase aus Pseudomonas stutzeri durch Dextran (■) und Pullulan (●).

Die Abbildung zeigt ausserdem, dass Pullulan ein effektiverer Inhibitor ist als das Dextran. Die Inhibitorkonstante K_i für Pullulan als Inhibitor wurde nach der von DIXON beschriebenen graphischen Methode ermittelt (81, 82) und ist in Abbildung 18 dargestellt.

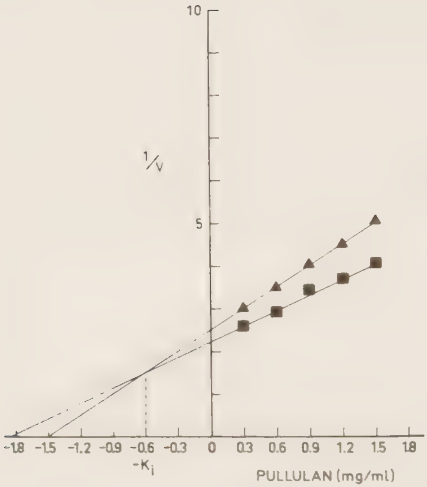

Abb. 18.: Bestimmung der Inhibitorkonstanten K_i nach der Methode von DIXON bei Verwendung von Pullulan als Inhibitor. S_1 (—■—); S_2 (—▲—). $S_1 = 4\ S_2$.

Für beide Geraden S_1 und S_2 ist der Wert für $1/V$ und für die Abzisse am Schnittpunkt gleich. Aus diesem Grund muss auch die Reaktionsgeschwindigkeit V gleich sein (81). Da bei der kompetitiven Hemmung V unverändert bleibt, liegt bei Pullulan als Inhibitor ebenfalls dieser Hemmungstyp vor.

Die in Abbildung 11 dargestellte Zeit-Umsatzkurve der Amylase aus Ps. stutzeri mit Stärke zeigt, dass das Produkt Maltotetraose in der Lage ist, das Enzym zu hemmen. Die Abbildung 19 zeigt die Hemmung der Amylase durch G 4, wobei ein K_i von 3×10^{-3} M ermittelt wurde.

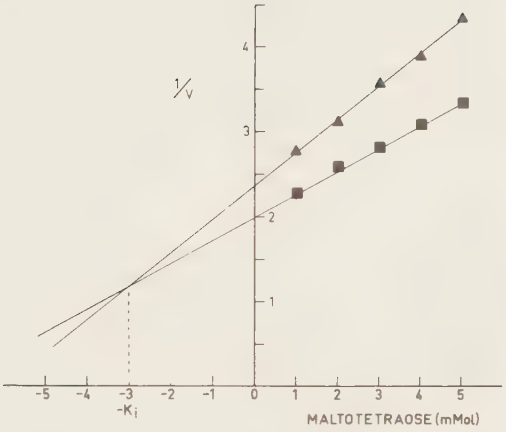

Abb. 19. : Hemmung der Amylase aus Ps. stutzeri durch Maltotetraose. Bestimmung der Inhibitor-Konstanten K_i nach der Methode von DIXON. S_1 (—■—); S_2 (—▲—). $S_1 = 4\ S_2$.

Wie bei der Hemmung der Amylase durch Dextran und Pullulan liegt hier eine kompetitive Hemmung vor, in diesem Fall jedoch durch das Produkt des Enzyms.

Die Hemmung von Amylasen durch Schardinger-Dextrine wurde durch verschiedene Autoren bereits beschrieben (96, 97, 98, 100, 117). Auch die Hemmung der Amylase aus Ps. stutzeri durch Schardinger-Dextrine wurde bereits untersucht (117). Nach MARSHALL wird die Amylase durch Cyclomaltohexaose (Schardinger - α - Dextrin) nicht gehemmt. ROBYT und ACKERMAN stellten fest, dass Schardinger-Dextrine kein Substrat für die Amylase aus Pseudomonas darstellen (6). Im Verlauf der Untersuchungen konnte auch hier bei Schardinger - α - Dextrin kein Einfluss auf die Amylase-Aktivität festgestellt werden, während bei der Inkubation der Amylase mit Blaustärke in Anwesenheit von Cycloheptamylose (Schardinger - β - Dextrin) eine starke Aktivierung beobachtet werden konnte. Die Zunahme der Aktivität durch verschiedene Konzentrationen an Cycloheptamylose ist in Abbildung 20 dargestellt.

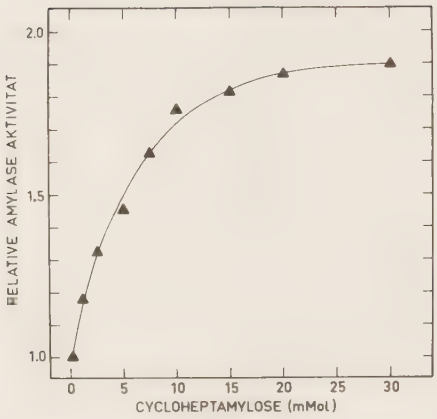

Abb. 20.: Aktivierung der Amylase aus Ps. stutzeri durch Cycloheptamylose (Schardinger - ß - Dextrin). Ermittlung der Aktivität durch PHADEBAS - Test, 15 Min., 37 °C.

Dieser Effekt der Aktivierung konnte jedoch nur mit dem PHADEBAS® - Amylase - Test nachgewiesen werden. Eine Messung der in Anwesenheit von Cycloheptamylose aus Stärke freigesetzten reduzierenden Zucker mit DNSS (vgl. 2.2.7.) ergab keine Aktivitätssteigerung. Der Versuch wurde mit Cycloheptamylose von verschiedenen Herstellern (Sigma, Serva, Pierce) wiederholt, und es wurden stets die gleichen Ergebnisse gefunden.

Worauf diese Zunahme der Aktivität beruht, ist zur Zeit völlig unklar. Eine Aktivierung des Abbaus von Blaustärke könnte möglicherweise dadurch zustande kommen, dass der Effektor Cycloheptamylose durch Anlagerung an das aktive Zentrum des Enzyms die katalytischen Eigenschaften der Amylase gegenüber diesem speziellen Substrat wesentlich verbessert.

3.8. Einfluss von EDTA und Calcium auf die Amylase-Aktivität

Es wird angenommen, dass alle endogen wirkenden Amylasen Metallo-Proteine sind, die Calcium enthalten (107, 118, 119, 120). Entfernt man das Calcium durch Behandlung der Amylasen mit EDTA , so werden die Enzyme reversibel inaktiviert. Durch Zugabe von Ca^{2+} - Ionen kann die ursprüngliche Aktivität wieder hergestellt werden. - Auch für die Aktivität der Amylase aus Ps. stutzeri ist Calcium notwendig, wie aus Tabelle 3 hervorgeht.

Tab. 3.: Einfluss von EDTA und Calcium auf die Amylase-Aktivität

Zusatz	Konzentration im Inkubationsansatz	Relative Amylase-Aktivität
1) Kein	----	100 %
2) $CaCl_2$ $4H_2O$	2 mM	151 %
3) EDTA	10 mM	25 %
4) EDTA + $CaCl_2$ $4H_2O$	10 mM + 15 mM	100 %
5) Cycloheptamylose + $CaCl_2$ $4H_2O$	30 mM 2 mM	190 %*

* bezogen auf den Inkubationsansatz, der 2 mM $CaCl_2$ enthielt. Die Aktivitätssteigerung durch Cycloheptamylose konnte durch DNSS nicht nachgewiesen werden. Der Inkubationsansatz (4,2 ml) enthielt 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, EDTA und $CaCl_2$ wie angegeben und 100 m U Enzym. Nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe einer PHADEBAS - Amylase - Test - Tablette gestartet.

Die Tatsache, dass die Pseudomonas-Amylase Ca^{2+} - Ionen benötigt, ist zwar kein Beweis für einen Endomechanismus dieses Enzyms, es ist aber eine weitere Gemeinsamkeit mit den Endoamylasen aus anderen Organismen (120).

Um sicherzustellen, dass die Aktivitätssteigerung durch Cycloheptamylose nicht durch Verunreinigungen der verschiedenen Präparate mit Calcium zustandegekommen ist,

wurde die relative Amylase-Aktivität auf einen Testansatz bezogen, der 2 m M Ca^{2+} enthielt. Wie Tabelle 3 zeigt, konnte trotzdem eine Aktivitätssteigerung von 190 Prozent festgestellt werden.

3.9. Einfluss von Schwermetallionen und Thiol-Reagenzien auf die Amylase-Aktivität

Die Behandlung mit 50 m M Jodacetamid (Inkubationsdauer: 4,5 Stunden) führte zu einer 57 %igen Hemmung der Amylase-Aktivität. Nach Behandlung der mit Jodacetamid inaktivierten Probe mit 2-Merkaptoäthanol oder 1.4-DTT (5 m Mol, 15 Minuten, 30 °C) konnte die Hemmung nicht rückgängig gemacht werden (121), sondern die Aktivität nahm weiter ab.

Schwermetallionen wie Hg^{2+}, Cu^{2+} und Zn^{2+} hemmen die Amylase vollständig.

3.10. Induktion der Transferasen

Beim Stärkestoffwechsel von Ps. stutzeri wird durch die Wirkung der extrazellulären Amylase aus Stärke Maltotetraose frei, welche durch weitere Einwirkung des Enzyms langsam zu Maltotriose und Maltose gespalten wird. Die Maltooligosaccharide werden durch eine Maltodextrin-Permease (23) in die Zelle transportiert und dort mit Hilfe der Transferasen Amylomaltase und D-Enzym in den intermediären Stoffwechsel eingeschleust.

Um die Induktion dieser Transferasen in den Zellen durch Maltooligosaccharide zu untersuchen, wurde Ps. stutzeri zunächst in einem Minimal-Medium mit Glycerin als einziger C-Quelle kultiviert, bis die Zellen die expotentielle Phase erreicht hatten. Anschliessend wurden die jeweiligen Induktoren (Maltose oder Maltotetraose) zugegeben und im Verlauf des weiteren Wachstums regelmässig Proben genommen. Die entnommenen Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. Aus dem Zellextrakt konnte dann die Transferase-Aktivität und das Bakterienprotein bestimmt werden.

Bei Ps. stutzeri kann die Synthese der Transferasen durch Zugabe von Maltose induziert werden, wie in Abbildung 21 dargestellt ist. Dabei ist die Bildung der Transferasen eine lineare Funktion der Zunahme an Bakterienprotein.

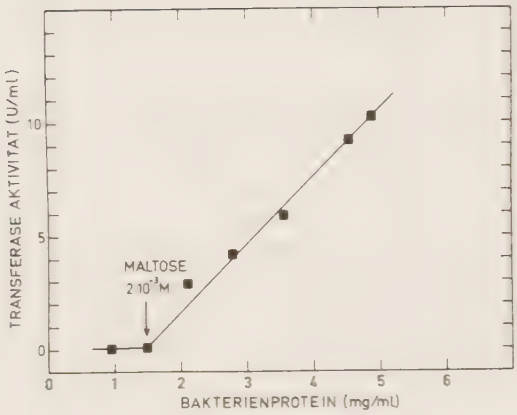

Abb. 21. : Induktion der Transferasen in Ps. stutzeri durch Maltose. Eine Zellkultur mit Glycerin-Minimal-Medium wurde bis zum Erreichen der expotentiellen Phase geschüttelt. Der Pfeil markiert die Zugabe des Induktors Maltose mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ M im Medium. Die Zunahme der Transferase-Aktivität in den Zellen und das Bakterienprotein wurden stündlich gemessen (—■—), wie im experimentellen Teil beschrieben.

In einem anderen Versuch wurde Maltotetraose als Induktor zugesetzt. Die Abbildung 22 zeigt dabei den gleichen Kurvenanstieg wie bei der Zugabe von Maltose (Abb. 21), woraus geschlossen werden kann, dass beide Oligosaccharide die gleiche induzierende Wirkung haben.

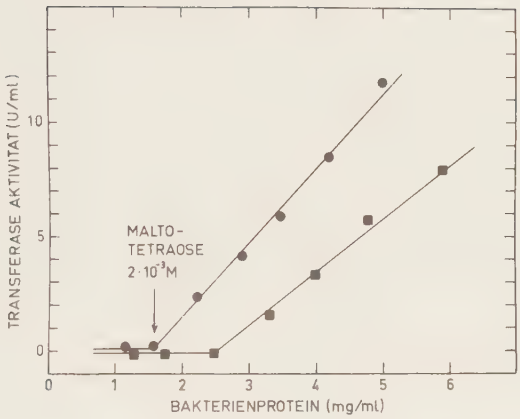

Abb. 22.: Einfluss von Glucose auf die Synthese der Transferasen, welche durch Maltotetraose induziert werden. Nach Erreichen der expotentiellen Phase wurde der Induktor Maltotetraose ($2 \cdot 10^{-3}$ M Endkonzentration) zugegeben und die Aktivität stündlich gemessen (—●—). Zum selben Zeitpunkt wurde in einem weiteren Kolben neben der gleichen Menge Maltotetraose ausserdem $2 \cdot 10^{-3}$ M Glucose hinzugegeben und ebenfalls die Transferase-Aktivität gemessen (—■—).

Wie Abbildung 22 weiter zeigt, lässt sich die Induktion der Transferasen durch Glucose reprimieren ($2 \cdot 10^{-3}$ M Glucose, Endkonzentration im Medium). Die Glucose reprimiert als die besser verwertbare Kohlenstoffquelle die Induktion der Transferasen. Erst nachdem die Glucosekonzentration im Medium unter einen bestimmten Wert absinkt, steigt die Transferase-Aktivität an, erreicht aber nicht den Anstieg der Kurve ohne Glucose.

3.11. Reinigung der Transferasen

Die Amylomaltase und das D-Enzym wurden in sechs Schritten gereinigt. Dabei konnte das D-Enzym 98-fach und die Amylomaltase 248-fach angereichert werden. In Tabelle 4 sind die verschiedenen Reinigungsschritte mit den jeweiligen spezifischen Aktivitäten für beide Transferasen zusammengefasst.

Tab. 4.: Reinigungsschema für die Transferasen aus Pseudomonas stutzeri

Reinigungsschritt	Volumen-Aktivität U/ml	Protein mg/ml	Spezifische Aktivität U/mg Protein	Reinigungsfaktor
Sonificat	57	14,5	4	1,0
Fällung mit Ammoniumsulfat (70 % Sättigung)	179	28,3	6,3	1,6
Chromatographie an Sepharose 6B	91	2,27	40	10
Chromatographie an DEAE-Sephadex A-50	62	1,29	48	12
Chromatographie an Bio-Gel P-150				
a) D-ENZYM	208	1,1	189	47
b) AMYLOMALTASE	201	0,73	275	69
Chromatographie an Hydroxylapatit (DNA-Grade)				
a) D-ENZYM	82	0,21	391	98
b) AMYLOMALTASE	99	0,1	990	248

Wie aus der Reinigungstabelle hervorgeht, liegen bei Ps. stutzeri die Transferasen in erheblich geringeren Mengen vor als beispielsweise die Amylomaltase bei E. coli ML 30 (vgl. 2.1.5.), bei der 18 % des Zellproteins als Amylomaltase vorliegt (31). Daher mussten am Anfang der verschiedenen chromatographischen Reinigungsschritte zunächst

sehr grosse Probemengen aufgegeben werden, um für die weiteren Schritte genügend Protein zu haben.

Nach der Fällung des Proteins mit Ammoniumsulfat aus dem zellfreien Extrakt (70 % Sättigung) wurde eine Chromatographie an Sepharose 6 B durchgeführt, ein Material, welches in einem verhältnismässig breiten Molekulargewichtsbereich trennt, und das die Aufgabe von grossen Probemengen gestattet. Die auf die Säule gegebene Probe war sehr viskos, denn auch nach der Ammoniumsulfatfällung befanden sich im konzentrierten zellfreien Extrakt noch erhebliche Mengen des vom Bakterium gebildeten Polysaccharides (64), das trotz mehrfachen Waschens der Zellen mit Puffer nicht völlig entfernt werden konnte. An diesem Polysaccharid waren ausserdem erhebliche Mengen Amylase gebunden.

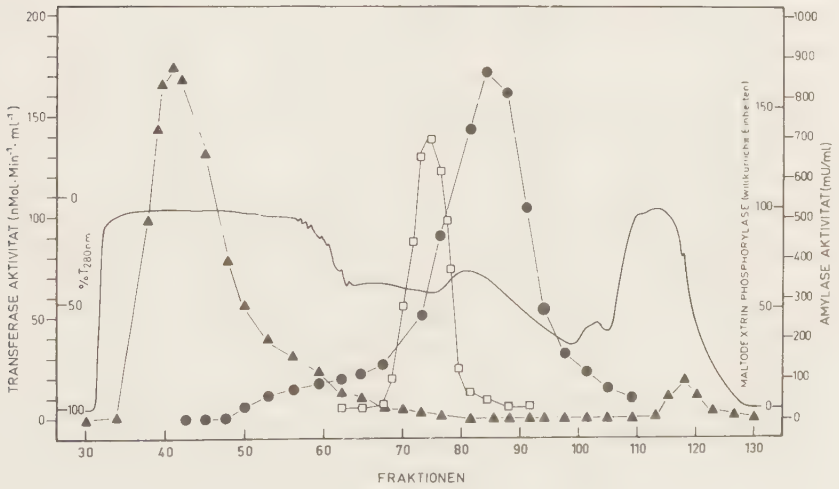

Abb. 23.: Chromatographie der Transferasen aus Ps. stutzeri an Sepharose-6B. Gelbett, 80 x 2,5 cm; Säulentemperatur, 4 °C; Elution mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0); Fliessrate, 12 ml/h; gesammelt wurden 3 ml pro Fraktion. Probe, 7,0 ml (40,3 mg Protein/ml; spezifische Aktivität 6,3 U/mg Protein). Transmission bei 280 nm (——). In den Fraktionen wurde die Transferase-Aktivität (—●—), die Amylase-Aktivität (—▲—) und die Maltodextrin-Phosphorylase-Aktivität bestimmt (—□—).

Durch die Chromatographie an Sepharose - 6 B konnte ein grosser Teil des Polysaccharids, die Amylase und ein Teil der Maltodextrin-Phosphorylase abgetrennt werden, wie Abbildung 23 zeigt. Die Transferase-Aktivität wurde als einheitlicher Peak von der Säule eluiert.

Um die Phosphorylase und das restliche Polysaccharid endgültig zu entfernen, wurde das Protein an DEAE - Sephadex A-50 chromatographiert. Das viskose Polysaccharid, das bei allen weiteren Reinigungsschritten empfindlich gestört hätte, wird nicht von der Ionenaustauschersäule adsorbiert und kann daher auf einfache Weise von der Transferase-Aktivität, die erst durch einen starken Kochsalzgradienten von der Säule eluiert wird, getrennt werden.

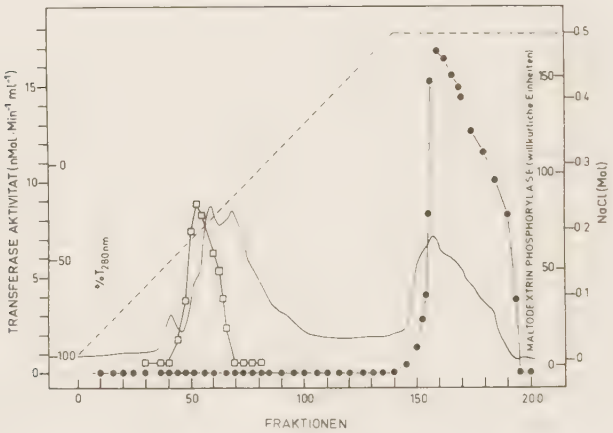

Abb. 24.: Trennung der Transferasen aus Ps. stutzeri von der Maltodextrin-Phosphorylase an DEAE - Sephadex A-50. Die Enzyme wurden mit einem NaCl-Gradienten (– – –) von der Säule eluiert, wie im experimentellen Teil beschrieben. Transmission bei 280 nm (———); Transferase-Aktivität (—●—); Aktivität der Maltodextrin-Phosphorylase (—□—). Chromatographische Bedingungen: Gelbett, 20 x 2,5 cm; Säulentemperatur, 4°C; Startpuffer, 0,1 M Tris · HCl (pH 7,6); Gradientenpuffer, 0,5 M NaCl in 0,1 M Tris · HCl (pH 7,6); Elutionsgeschwindigkeit, 20 ml/h; das Eluat wurde in Fraktionen von je 4,3 ml gesammelt. Probe, 4,0 ml (24,7 mg Protein) ml; spezifische Aktivität 40 U·mg Protein⁻¹.

Die Abbildung 24 zeigt, dass ausserdem eine gute Trennung der Transferasen von der Maltodextrin-Phosphorylase erreicht wurde, die mit einer verhältnismässig niedrigen NaCl-Konzentration von der Säule eluiert werden konnte. Die Fraktionen mit Transferase-Aktivität wurden gesammelt, konzentriert (Amicon, PM 10 Membran) und durch Gelchromatographie an Bio-Gel P-150 weiter getrennt.

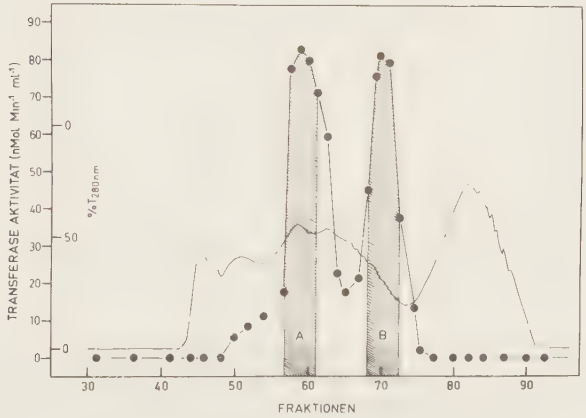

Abb. 25 : Trennung des D-Enzyms von der Amylomaltase an Bio-Gel P-150. Gelbett, 110 x 2,5 cm; Säulentemperatur, 8 °C; Elution mit 70 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) ; Fliessrate, 8 ml/h. Gesammelt wurden 3 ml pro Fraktion. Probe, 2,5 ml (17,2 mg Protein/ml ; spezifische Aktivität 48 U/mg Protein). Transmission bei 280 nm (——); Transferase-Aktivität (–●–). Die Fraktionen unter den schraffierten Flächen wurden gesammelt und zur Fraktion A (D-Enzym), sowie zur Fraktion B (Amylomaltase) vereint.

Bei der Gelchromatographie werden die Substanzen auf Grund unterschiedlicher Molekülgrössen getrennt und in der Reihenfolge abnehmender Molekulargewichte eluiert (122). Die Abbildung 25 zeigt bei der Trennung an Bio-Gel P-150 zwei unterschiedliche Peaks A und B mit Transferase-Aktivität, wobei bei diesem Trennprinzip der Peak A ein höheres Molekulargewicht hat als Peak B. Die Fraktionen der jeweiligen Peaks wurden gesammelt (schraffierte Flächen) und getrennt an Hydroxylapatit weiter gereinigt.

Wie später gezeigt wird, ist die Fraktion A das D-Enzym, während Fraktion B die Amylomaltase darstellt.

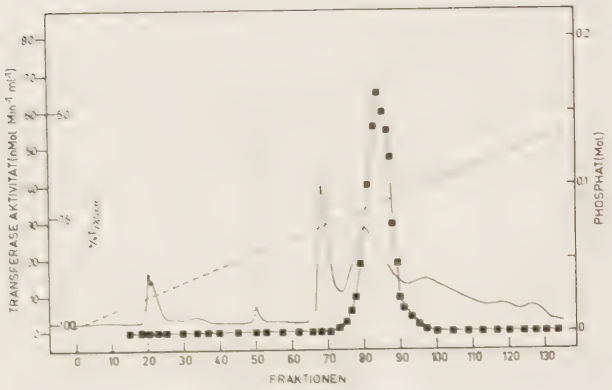

Abb. 26.: Chromatographie des D-Enzyms aus Ps. stutzeri an Hydroxylapatit DNA-Grade. Säule, 57 x 0,9 cm; Säulentemperatur, 8° C; Elutionsmittel, 5 m Mol - 200 m M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8); Fliessrate, 8,0 ml/h. Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten von der Säule eluiert (– – –). Pro Fraktion wurden 1,5 ml gesammelt. Probe, 1,5 ml (15 mg Protein ml; spezifische Aktivität 189 U mg Protein). Transmission bei 280 nm (———); Aktivität des D-Enzyms (—■—).

Wie die Abbildungen 26 und 27 zeigen, konnte bei der Hydroxylapatitchromatographie des D-Enzyms und der Amylomaltase weiteres Fremdprotein abgetrennt werden. Bei dem D-Enzym wurde nach der HA-Chromatographie eine 98-fache Anreicherung - bezogen auf den zellfreien Extrakt - erreicht (Tab. 4), während die Anreicherung bei der Amylomaltase 248-fach war.

Nach Fällung der HA-gereinigten Transferase-Präparate mit Ammoniumsulfat und Aufbewahrung der Proteine über einen längeren Zeitraum im Kühlschrank (2 Monate, 4° C) stellte sich heraus, dass die Amylomaltase wesentlich stabiler war als das D-Enzym, bei dem erhebliche Aktivitätsverluste auftraten.

Die nach Hydroxylapatit gereinigten Transferasen wurden für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

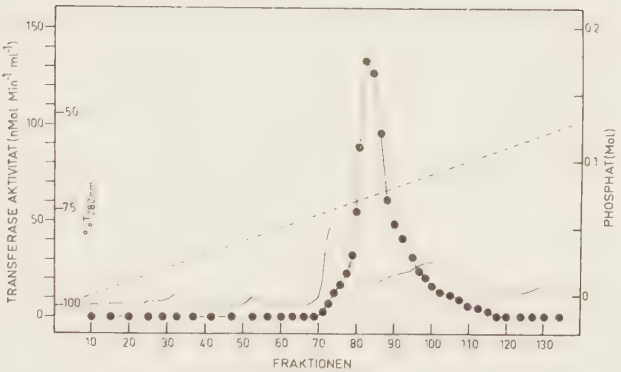

Abb. 27.: Chromatographie der Amylomaltase aus Ps. stutzeri an Hydroxylapatit DNA-Grade. Die chromatographischen Bedingungen waren die gleichen wie in Abb. 26. (– – –) linearer Gradient; Transmission bei 280 nm (———); Amylomaltase-Aktivität (—●—). Probe, 2,0 ml (10,5 mg Protein/ml; spezifische Aktivität 275 U/mg Protein).

3.12. Molekulargewichtsbestimmung an Sephadex G-200

Das Molekulargewicht der Transferasen wurde zunächst durch Gelchromatographie an Sephadex G-200 bestimmt. Wie im experimentellen Teil beschrieben (vgl. 2.2.12), wurde die Säule mit verschiedenen Proteinen geeicht. Dazu wurden die Elutionsvolumina (V_e) der Eichproteine ermittelt, der jeweilige Quotient aus V_e/V_o errechnet und gegen die bekannten Molekulargewichte im halblogarithmischen Maßstab aufgetragen. Anschliessend konnten die Molekulargewichte der Transferasen nach der Ermittlung ihres relativen Elutionsquotienten V_e/V_o mit Hilfe der in Abbildung 28 dargestellten Eichkurve bestimmt werden.

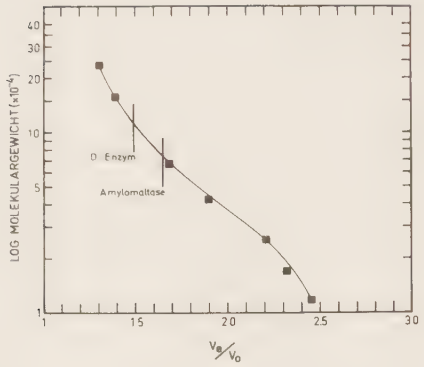

Abb. 28.: Bestimmung des Molekulargewichts des D-Enzyms und der Amylomaltase durch Chromatographie an Sephadex G-200. Halblogarithmische Darstellung des Molekulargewichts gegen den Quotienten aus dem Elutionsvolumen verschiedener Proteine (V_e) mit dem Ausschlussvolumen (V_o). Die vertikalen Linien zeigen die ermittelten Werte für das D-Enzym und Amylomaltase. Folgende Eichproteine (—■—) wurden verwendet: Catalase (M.G. 240.000); Aldolase (160.000); BSA (68.000); Ovalbumin (43.000); Chymotrypsinogen A (25.700); Myoglobin (17.200) und Cytochrom c (11.700). Chromatographische Bedingungen: Gelbett, 81 x 2,5 cm; Elution mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0); Elutionsgeschwindigkeit, 18 ml/h.

Für die Amylomaltase aus Ps. stutzeri wurde ein Wert von 74.000 Daltons ermittelt. Dieser Wert ist nur etwas höher als das von HÄSELBARTH et al. (123) und PALMER et al. (30) bestimmte Molekulargewicht der Amylomaltase aus E. coli ML, das mit 71.000 Daltons angegeben wird.

Für das D-Enzym wurde ein Molekulargewicht von 115.000 Daltons ermittelt. Wie bereits bei der Reinigung der Transferasen an Bio-Gel P-150 angedeutet wurde, ist das D-Enzym somit erheblich grösser als die Amylomaltase.

3.13. SDS - Gel - Elektrophorese

Neben der Molekulargewichtsbestimmung an Sephadex G-200 wurde das M. G. der Transferasen darüber hinaus durch SDS-PAGE ermittelt. Diese Methode gestattete es ausserdem, Untereinheiten nachzuweisen. Hierfür wurde ein 12,5%iges Trenngel gewählt. Mit den Transferasen wurden sieben verschiedene Eichproteine elektrophoriert, deren Beweglichkeit relativ zur Bromphenolblaufront anschliessend gemessen wurde.

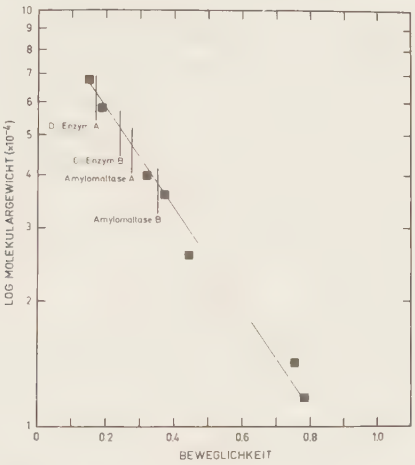

Abb. 29.: Halblogarithmische Darstellung des Molekulargewichts verschiedener Proteine gegen die Beweglichkeit relativ zur Bromphenolblaufront nach diskontinuierlicher Elektrophorese in 12,5%igem Gel in Gegenwart von 0,1% SDS. Die vertikalen Linien zeigen die ermittelten Werte der Protomeren A und B von D-Enzym und Amylomaltase aus Ps. stutzeri. Als Eichproteine (—■—) wurden verwendet: BSA (M. G. 68.000); Catalase (58.000); Aldolase (40.000); LDH (36.000); Chymotrypsinogen A (25.700); Lysozym (14.300); Cytochrom c (11.700).

Wie die Eichkurve in Abbildung 29 zeigt, wurden bei jeder Transferase zwei Proteinbanden mit unterschiedlichem Molekulargewicht gefunden. Die beiden Proteinbanden der Amylomaltase haben ein Molekulargewicht von 38.000 Daltons und 47.000 Daltons, was ein M. G. von 85.000 Daltons für das native Enzym ergibt. Dieser Wert liegt etwas höher als das gelchromatographisch ermittelte Molekulargewicht von 74.000 Daltons.

Für das D-Enzym wurde gelchromatographisch ein Molekulargewicht von 115.000 Daltons ermittelt. Dieser Wert stimmt mit dem durch SDS-PAGE ermittelten Molekulargewicht überein. Die beiden Untereinheiten des D-Enzyms haben ein Molekulargewicht von 63.000 Daltons und 52.000 Daltons (Abb. 29).

3.14. Spezifität und Eigenschaften der Amylomaltase aus Ps. stutzeri

3.14.1. Einfluss von pH und Temperatur auf die Aktivität der Amylomaltase

Die Amylomaltase aus Ps. stutzeri weist eine verhältnismässig breite pH-Kurve mit einem Optimum bei pH 7,7 auf (Abb. 30). Ähnlich wie bei der Maltotetraose-bildenden Amylase (16) weist diese Transferase im alkalischen Bereich eine nennenswerte Aktivität auf, so dass zum Beispiel bei pH 9,0 noch 80% der maximalen Aktivität nachweisbar ist.

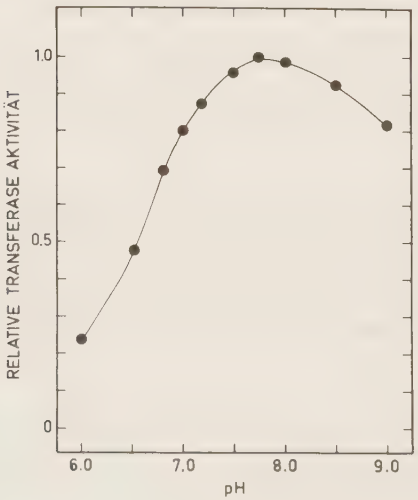

Abb. 30.: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der Amylomaltase

Das Optimum des Pseudomonas-Enzyms unterscheidet sich wesentlich von dem pH-Optimum der Amylomaltase aus E. coli, deren Optimum bei pH 6,8 liegt (28).

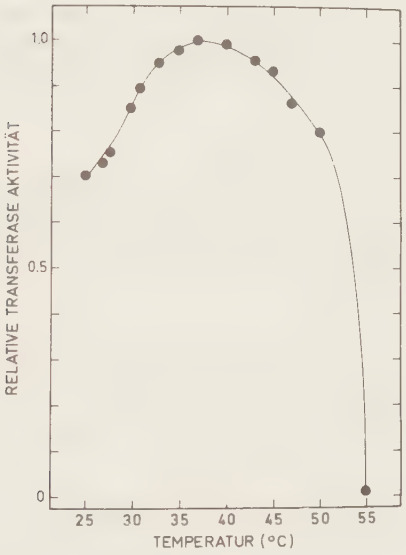

Abb. 31.: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der Amylomaltase

Das Temperatur-Optimum für die Amylomaltase beträgt 37 °C, und erst bei einer Temperatur von 50 °C nimmt die Aktivität rasch ab (Abb. 31).

3.14.2. Enzymatische Synthese von Maltodextrinen

Die Amylomaltase wurde bislang als Glycosyltransferase definiert, welche folgende Reaktion katalysiert:

$$\text{Maltose} + (\alpha\text{-}1,4\text{-Glucan})_n \rightleftharpoons (\alpha\text{-}1,4\,\text{Glucan})_{n+1} + \text{Glucose}$$

Es wurde angenommen, dass das Enzym die Übertragung des nicht reduzierenden Glucosylanteils von Maltose auf ein Maltodextrin, dem Akzeptorsubstrat, katalysiert. Maltose ist dabei als wichtigstes Substrat für die Amylomaltase angesehen worden (28, 124, 125).

Kürzlich konnten PALMER, RYMAN und WHELAN zeigen, dass Amylomaltase bei der Synthese von Maltodextrinen nicht nur Glucosereste überträgt, sondern dass auch α-1,4-Glucanosylketten bis zu einer Länge von 9 Glucoseresten durch dieses Enzym übertragen werden können (30).

Durch Chromatographie der von der Amylomaltase aus Maltodextrinen gebildeten Kohlenhydrate an dem Polyacrylamidgel Bio-Gel P-2 (59, 60), erhält man je nach Substrat verschiedene Wirkungsmuster des Enzyms, die in den folgenden Abbildungen dargestellt sind.

Um die Amylomaltase aus Ps. stutzeri mit dem bekannten Enzym aus E. coli zu vergleichen, wurden beide Transferasen mit Maltotetraose inkubiert und die Reaktionsmischung anschliessend gelchromatographisch getrennt.

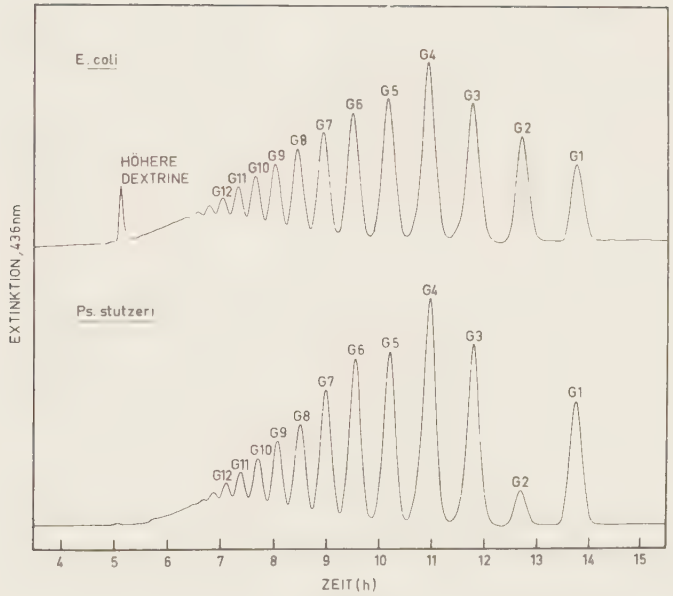

Abb. 32.: Trennung von Glucose und Maltodextrinen, welche durch die Wirkung von den Amylomaltasen aus E. coli und Ps. stutzeri aus Maltotetraose (G 4) synthetisiert wurden. Säule, 200 x 1,5 cm; Bio-Gel P-2, minus 400 mesh; Elutionsgeschwindigkeit, 24 ml/h. Alle weiteren chromatographischen Bedingungen waren die gleichen wie in Abb. 11. Es wurden jeweils 90 µl einer 2%igen Lösung als Probe aufgegeben.

Die Abbildung 32 zeigt die Elutionsdiagramme der Amylomaltase aus E.coli und Ps.stutzeri mit Maltotetraose als Substrat. Die Amylomaltase aus E.coli liefert eine homologe Reihe von Maltodextrinen bis zu höheren Dextrinen, bei denen es sich um Amylodextrine handelt, die mit Jod eine blauviolette Färbung ergeben. Charakteristisch ist dabei auf dem Chromatogramm der gleichmäßige Anstieg der Konzentration der Reaktionsprodukte von den höheren Dextrinen bis zur Maltotetraose und der ebenso gleichmäßige Konzentrationsabfall bis zur Glucose.

Ein etwas anderes Elutionsdiagramm liefert die Amylomaltase aus Pseudomonas stutzeri. Auffallend ist die geringe Konzentration an Maltose (G 2) und das Fehlen der höheren Dextrine. Im Gegensatz zum E.coli - Enzym konnten durch die Wirkung der Amylomaltase aus Ps.stutzeri keine Reaktionsprodukte, die mit Jod eine Färbung ergaben, gebildet werden.

Die Abbildung 33 zeigt die Wirkung der Amylomaltase aus Ps.stutzeri auf Maltotriose (Abb. 33 A), Maltopentaose (Abb. 33 B) und Maltohexaose (Abb. 33 C). Auffallend ist bei den Elutionsdiagrammen 33 A und 33 B wieder die geringe Konzentration an Maltose im Reaktionsgemisch. Ebenso wie bei der Inkubation von Maltotetraose entstehen auch bei der Einwirkung des Enzyms auf Maltotriose und Maltopentaose homologe Reihen von höheren Maltodextrinen.

Ein völlig unerwartetes Wirkungsmuster liefert die Reaktion der Amylomaltase mit Maltohexaose. Wie aus dem Chromatogramm 33 C zu ersehen ist, wird die Maltohexaose zu kleineren Maltodextrinen abgebaut, während keine nennenswerten Mengen an höheren Maltodextrinen aus G6 synthetisiert werden.

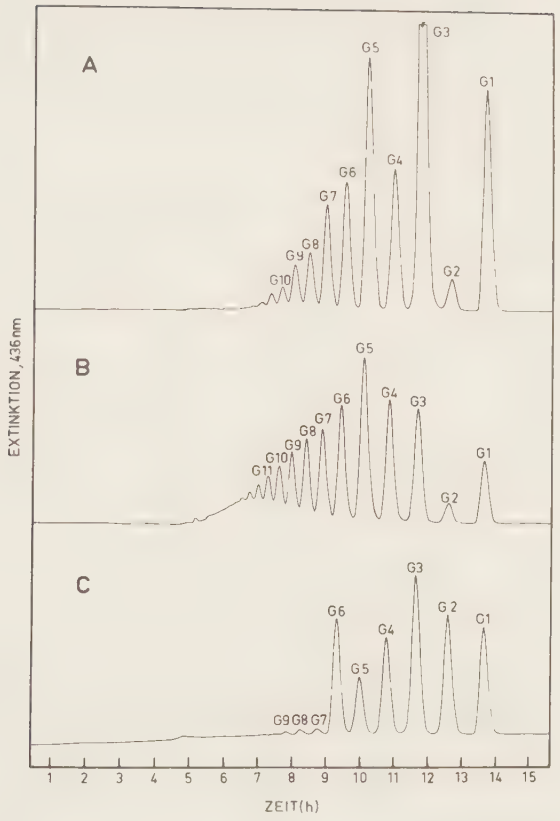

Abb. 33.: Enzymatische Synthese von Maltodextrinen aus Maltotriose (A), Maltopentaose (B) und Maltohexaose (C) durch die Wirkung von Amylomaltase aus Ps. stutzeri und Trennung der entstandenen Glucose und höheren Polymere an Bio-Gel P-2. Probe, bei Chromatogramm A und B 90 µl einer 2%igen Lösung, bei Chromatogramm C 80 µl einer 2%igen Lösung. Alle übrigen chromatographischen Bedingungen waren wie in Abb. 11.

3.14.3. Nachweis von α-1,4-glykosidischen Bindungen

Zum Nachweis der α-1,4-glykosidischen Bindungen in den durch Amylomaltase synthetisierten Maltodextrinen, wurden diese mit β-Amylase inkubiert. Das Gelchromatogramm in Abb. 34 zeigt, dass durch die Einwirkung der ß-Amylase im wesentlichen Maltose entstanden ist. Die geringe Glucosemenge ist durch die Hydrolyse von Maltotriose gebildet worden.

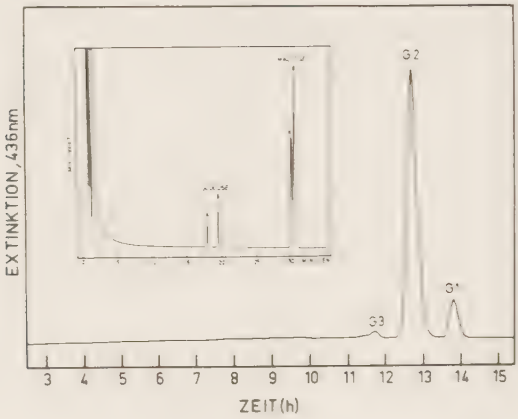

Abb. 34.: Gelchromatographie des Abbaus von Maltodextrinen durch ß-Amylase an Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm). Die Maltodextrine wurden aus Maltotetraose durch die Amylomaltase aus Ps. stutzeri synthetisiert. Das Gaschromatogramm im oberen Teil zeigt die Trennung des gleichen Hydrolysats als Polytrimethylsilyläther. Säule, 3% OV - 17 auf HP Chromosorb G AW-DMCS (80/100 mesh) in Stahlrohr 3 m x 4 mm I.D.

Das Chromatogramm zeigt weiterhin, dass keine höheren Oligosaccharide als Maltotriose im Hydrolysat nachweisbar waren. Das Vorkommen von Glucose und Maltose im Hydrolysat wurde durch Gaschromatographie dieser Zucker als ihre flüchtigen Trimethylsilylderivate (87) bestätigt (Abbildung 34 oben).

Ein weiterer Beweis für das Vorliegen von α-1,4-glykosidischen Bindungen in den synthetisierten Kohlenhydraten ist die graphische Darstellung des Molekulargewichts

der Maltodextrine gegen den negativen Logarithmus des Verteilungskoeffizienten (K_d). Nach den Überlegungen von HJERTEN sollen nicht geknäuelte Kettenmoleküle einer homologen Reihe von niedermolekularen Polymeren einer Gleichung genügen, in der der negative Logarithmus des Verteilungskoeffizienten linear vom Molekulargewicht abhängt (88).

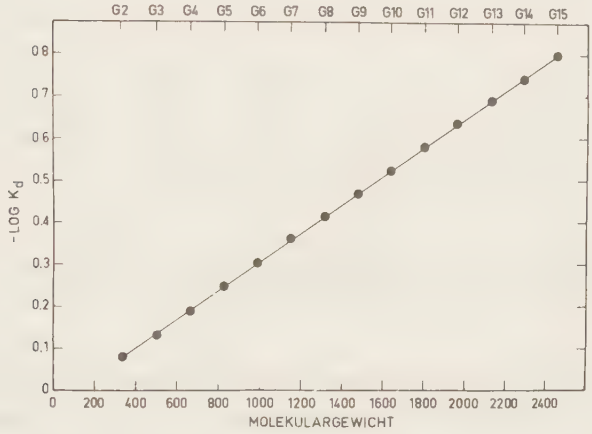

Abb. 35.: Darstellung von - log K_d gegen das Molekulargewicht von Maltodextrinen, die aus Maltotetraose durch die Wirkung von Amylomaltase aus Ps. stutzeri synthetisiert worden sind.

Wie aus Abbildung 35 zu ersehen ist, besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen - log K_d und dem M. G. der Maltodextrine.

3.14.4. Kinetische Messungen

Um die Affinität der Amylomaltase zur Maltose, Maltotriose und Maltotetraose darzustellen, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit (V) mit diesen Substraten und deren steigenden Konzentrationen gemessen.

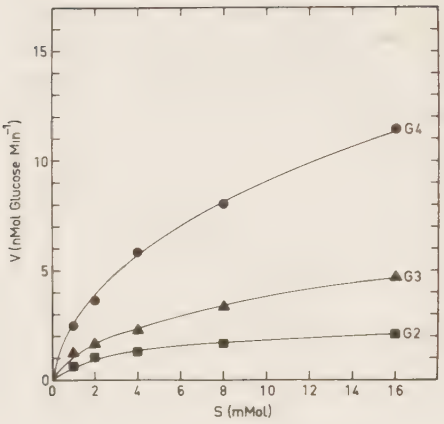

Abb. 36.: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit (V) als Funktion der Substratkonzentration (S) für Amylomaltase

Die Abbildung 36 zeigt, dass die Amylomaltase zur Maltotetraose die höchste Affinität hat, während die chromatographisch reine Maltose von dem Enzym nur sehr schwach umgesetzt wird. Auch bei der Amylomaltase aus E. coli wurde kürzlich gefunden, dass der Maltose nur eine begrenzte Rolle als Substrat zukommt. Nach PALMER, RYMAN und WHELAN (29, 30) fungiert Maltose nur als Akzeptormolekül, jedoch nicht als Donorsubstrat.

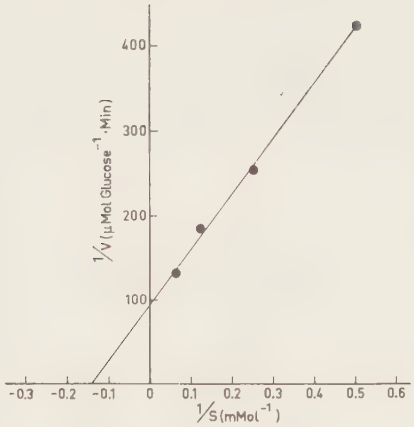

Abb. 37.: Lineweaver - Burk - Diagramm zur Ermittlung des K_m-Wertes der Amylomaltase aus Ps. stutzeri mit Maltotetraose als Substrat

Der K_m-Wert für Maltotetraose lässt sich aus der Darstellung nach LINEWEAVER und BURK (80) graphisch ermitteln (Abb. 37). Die Michaelis-Konstante mit Maltotetraose als Substrat beträgt nach der graphischen Auswertung der Abbildung 37 $7{,}1 \times 10^{-3}$ M. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) beträgt dabei 10,35 nmol Glucose · Min.$^{-1}$.

3.14.5. Einfluss von Metallionen, Kohlenhydraten und Thiol-Reagenzien auf die Aktivität der Amylomaltase

Der Einfluss verschiedener Metallionen und anderer Reagenzien wurde nach Vorinkubation (15 Minuten, 30° C) mit diesen Substanzen gemessen (Tabelle 5).

Tab. 5.: Einfluss von Metallionen und verschiedenen Reagenzien auf die Aktivität der Amylomaltase

Zusatz	Konzentration (Mol)	Verbleibende Aktivität (%)
K e i n	----	100 %
$CaCl_2 \cdot 4H_2O$	10^{-3}	100 %
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10^{-3}	100 %
$FeCl_2 \cdot 6H_2O$	10^{-3}	50 %
$ZnSO_4$	10^{-3}	20 %
$HgCl_2$	10^{-3}	15 %
EDTA $\cdot$ Na_2	10^{-3}	90 %
p CMB	10^{-3}	95 %
Jodacetamid	$2 \cdot 10^{-2}$	90 %
DTT	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$	90 %

Inkubationsbedingungen: Nach einer Vorinkubation von 15 Minuten mit dem jeweiligen Zusatz in 0,1 M Tris · HCl (pH 7,6) wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 mM Maltotetraose gestartet (30° C, 30 Minuten).

Die Amylomaltase wird durch Schwermetallionen wie Fe^{2+}, Zn^{2+} und Hg^{2+} gehemmt, wie Tabelle 5 zeigt. Ca^{2+}- und Mg^{2+}- Ionen haben keinen Einfluss auf die Aktivität. Wie Tabelle 5 weiterhin zeigt, haben Thiol-Reagenzien bei den angegebenen Konzentrationen nur einen sehr geringen Einfluss auf die Aktivität der Amylomaltase.

Weitere Verbindungen zeigten keine nachweisbare Hemmung der Enzymaktivität: Isomaltose, Isomaltotriose, Methyl-α-D-glucosid, Phenyl-ß-D-glucosid (10^{-2} Mol). Bei der Amylomaltase aus E. coli sind dagegen Methyl-α-D-glucosid und Phenyl-ß-D-glucosid kompetitive Inhibitoren (28).

Während Schardinger-ß-Dextrin (10^{-2} Mol) das Enzym nicht inhibiert, konnte bei der gleichen Konzentration von Schardinger-α-Dextrin die Amylomaltase-Aktivität um 25% gehemmt werden.

3.15. Spezifität und Eigenschaften des D-Enzyms aus Ps. stutzeri

3.15.1. Einfluss von pH und Temperatur auf die Aktivität des D-Enzyms

Im Gegensatz zur Amylomaltase zeigt das D-Enzym einen engen pH-Bereich optimaler Enzym-Aktivität mit einem Optimum bei pH 7,6 (Abb. 38).

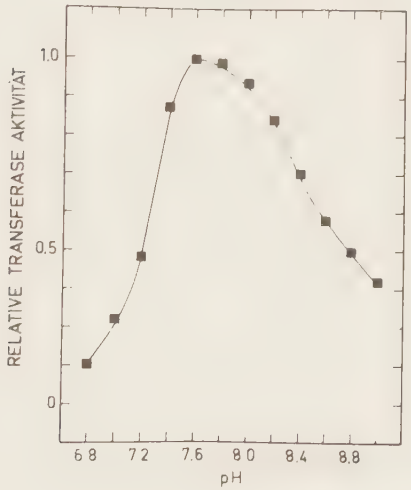

Abb. 38.: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität des D-Enzyms

Das Temperatur-Optimum liegt beim D-Enzym aus Ps. stutzeri bei 30 °C. Wie Abbildung 39 zeigt, ist dieses Enzym damit wesentlich empfindlicher gegenüber höheren Temperaturen als die Amylomaltase.

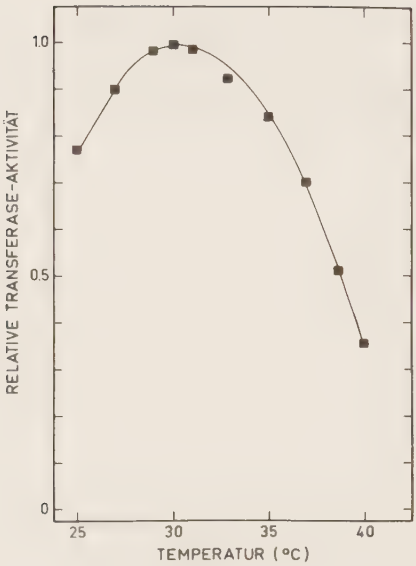

Abb. 39.: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität des D-Enzyms

3.15.2. Synthese von Maltodextrinen durch das D-Enzym

Als D-Enzym bezeichnet man eine Transglucosylase, welche zwei oder mehrere Glucosereste von einem Donorsubstrat (Maltotriose oder höhere Maltodextrine) auf einen Akzeptor (Glucose, Maltotriose oder höhere Maltodextrine) überträgt (22, 32, 34, 126). Bislang wurde das D-Enzym in höheren Pflanzen (32 - 35), Geweben von Tieren (38) und einigen Streptococcus-Arten gefunden (36, 37).

Das Enzym katalysiert die Disproportionierungsreaktion von Maltodextrinen, wie das Beispiel mit Maltotriose als Substrat zeigt:

(1) Maltotriose + Maltotriose $\rightleftharpoons$ Maltopentaose + Glucose

(2) Maltotriose + Maltopentaose $\rightleftharpoons$ Maltoheptaose + Glucose

(3) Maltotriose + Maltoheptaose $\rightleftharpoons$ Maltononaose + Glucose

Dass diese Reaktion auch für das Enzym aus Pseudomonas stutzeri zutrifft, zeigt die Abbildung 40 A, in der das D-Enzym mit Maltotriose als Substrat inkubiert wurde. Im Gleichgewichtszustand findet man im Inkubationsansatz Glucose und eine Reihe von Maltooligosacchariden bis zu den höheren Dextrinen, wobei in der Probe Maltopentaose, Maltoheptaose sowie G 9 und G 11, die durch Übertragung von Maltosylresten entstanden sind, in deutlich höherer Konzentration vorliegen als die anderen Produkte.

Abbildung 40 B zeigt die gelchromatographische Trennung der Produkte, die durch Inkubation von Maltotetraose mit dem D-Enzym entstanden sind. Durch Transglycosylierung von Maltotriosylresten wurden in dieser Reaktion hauptsächlich G 7, G 10 sowie G 13 und G 16 gebildet. Maltose entsteht dabei nicht in nennenswerten Mengen.

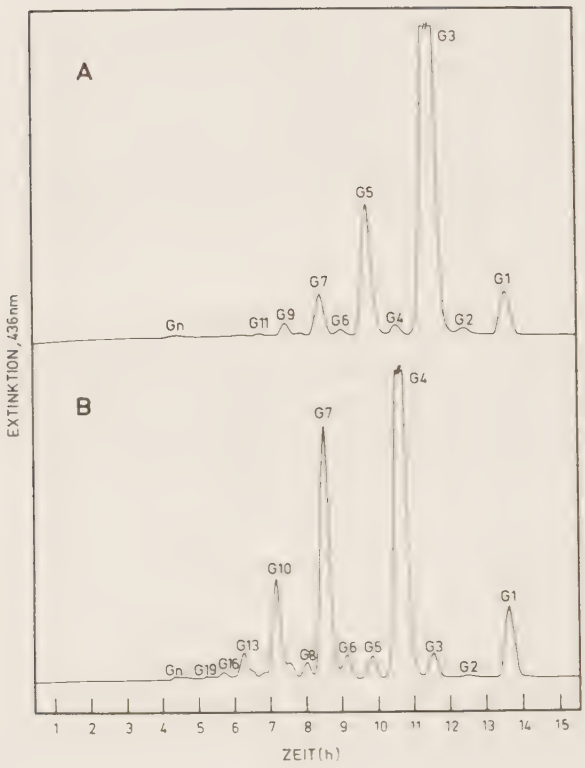

Abb. 40.: Gelchromatographische Trennung von Maltodextrinen, die durch Wirkung des D-Enzyms aus Maltotriose (A) und Maltotetraose (B) synthetisiert wurden. Säule, Bio-Gel P-2, minus 400 mesh (200 x 1,5 cm); Probe, 70 µl einer 2%igen Lösung. Die Inkubationsbedingungen sind im experimentellen Teil beschrieben. Die chromatographischen Bedingungen waren wie in Abb. 11.

In Abbildung 41 wird die Einwirkung des D-Enzyms auf Maltopentaose (Abb. 41 A) und Maltohexaose (Abb. 41 B) gezeigt. Durch Übertragung von Maltotetraose-Einheiten auf Maltopentaose entsteht Maltononaose (Abb. 41 A), während durch Übertragung von Maltopentaose-Einheiten auf Maltohexaose G 11 gebildet wird (Abb. 41 B).

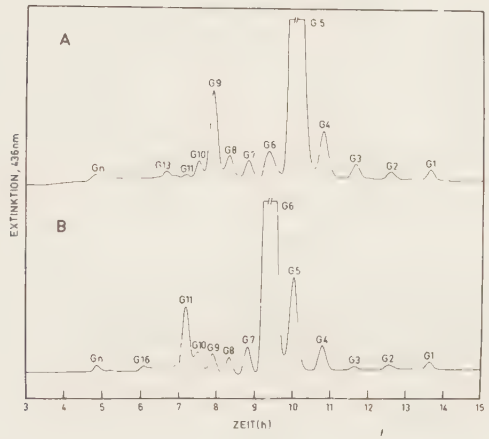

Abb. 41.: Enzymatische Synthese von Maltodextrinen aus Maltopentaose (A) und Maltohexaose (B) durch das D-Enzym und Trennung der entstandenen Kohlenhydrate an Bio-Gel P-2; Probe, 90 µl einer 2%igen Lösung. Alle übrigen chromatographischen Bedingungen waren wie in Abb. 11.

Unter den angegebenen Inkubationsbedingungen konnten in keinem Fall Reaktionsprodukte gebildet werden, die mit Jod eine Blaufärbung ergaben.

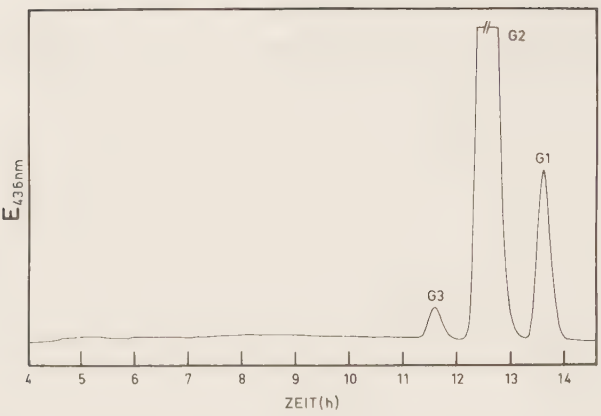

Abb. 42.: Gelchromatographische Trennung der Zucker, die durch die Wirkung des D-Enzyms aus Maltose entstanden sind, an Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm). Probe, 80 µl einer 2%igen Lösung. Die chromatographischen Bedingungen waren die gleichen wie in Abbildung 11.

Die Einwirkung des D-Enzyms aus Ps. stutzeri auf chromatographisch reine Maltose zeigt Abbildung 42. Das D-Enzym setzt aus Maltose einen erheblichen Teil Glucose frei. Darüber hinaus wird Glucose auf ein Maltosemolekül unter Bildung von Maltotriose übertragen. Wie Abbildung 42 ausserdem zeigt, liefert die Reaktion des D-Enzyms mit Maltose keine höheren Produkte als G 3.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von PEAT, WHELAN und REES (33, 34), die bei dem D-Enzym aus der Kartoffel gefunden haben, dass kleinere Einheiten als Maltose nicht übertragen werden können, und Maltose somit kein Donorsubstrat ist.

3.15.3. Nachweis von α-1,4-glykosidischen Bindungen

Bei der Einwirkung von ß-Amylase auf die Maltodextrine, die durch das D-Enzym gebildet worden sind, entsteht fast ausschliesslich Maltose, wie durch Chromatographie an Bio-Gel P-2 (200 x 1,5 cm) und durch Gaschromatographie nachgewiesen wurde.

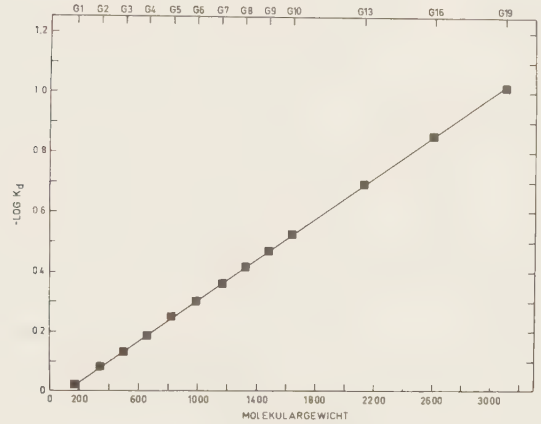

Abb. 43.: Darstellung von $-\log K_d$ gegen das Molekulargewicht von Glucose und Oligosacchariden, die durch Inkubation von Maltotetraose mit dem D-Enzym gebildet wurden.

Das Vorliegen von linear verknüpften Oligosacchariden wurde ausserdem durch die graphische Darstellung nach HJERTEN (88) nachgewiesen. Die Abbildung 43 zeigt, dass eine lineare Abhängigkeit zwischen $-\log K_d$ und den Molekulargewichten der durch das D-Enzym synthetisierten Maltodextrine besteht. Diese Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse anderer Autoren (32, 33), die auf ähnliche Weise nachgewiesen haben, dass das D-Enzym ausschliesslich α-1,4-glykosidische Bindungen knüpft.

3.15.4. Kinetische Messungen

Misst man die aus verschiedenen Oligosacchariden (G 2, G 3, G 4) durch das D-Enzym freigesetzte Glucose bei verschiedenen Substratkonzentrationen, so erhält man die in Abbildung 44 dargestellten Substratsättigungskurven.

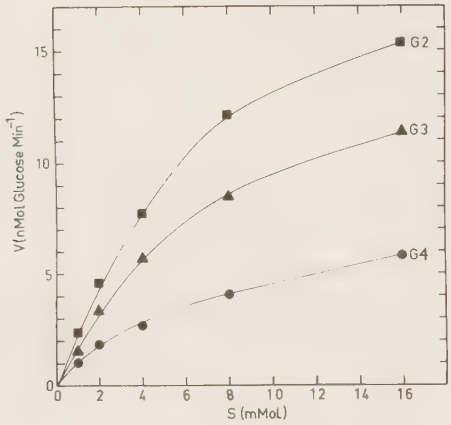

Abb.44 . : Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (V) von der Substratkonzentration (S) für verschiedene Maltodextrine und dem D-Enzym aus Ps. stutzeri.

Es zeigt sich, dass Maltose verhältnismässig gut umgesetzt wird, während mit zunehmender Kettenlänge aus den Maltooligosacchariden immer weniger Glucose freigesetzt wird. Daher kann vermutet werden, dass das D-Enzym hauptsächlich für die Verwertung von Maltose bei Pseudomonas stutzeri benötigt wird.

Bei der Einwirkung des D-Enzyms auf Maltotriose und Maltotetraose wird weniger Glucose freigesetzt als bei Maltose. Dafür werden aber aus G 3 und G4 , wie die vorhergehende Abbildung 40 zeigt, hauptsächlich höhere Maltodextrine in relativ hoher Konzentration gebildet, die ihrerseits als Primer oder Startermoleküle für die Amylomaltase dienen können.

Wie bereits erwähnt, ist die Maltose kein typisches Substrat für die Amylomaltase. Dieses Enzym benötigt für die Katalyse Maltodextrine als Primermoleküle (29, 30).

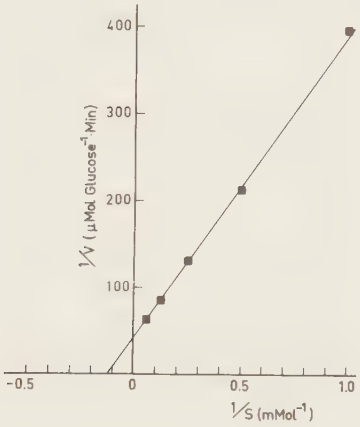

Abb. 45.: Lineweaver-Burk Diagramm zur Ermittlung des K_m-Wertes des D-Enzyms mit Maltose als Substrat

Der K_m-Wert für Maltose wurde nach LINEWEAVER und BURK (80) ermittelt und beträgt $8{,}3 \times 10^{-3}$ M (Abbildung 45). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) beträgt 25 n mol Glucose · Min.$^{-1}$.

3.15.5. Einfluss von Metallionen, Kohlenhydraten und Thiol-Reagenzien

Die Tabelle 6 zeigt, dass das D-Enzym durch Schwermetallionen, Thiol-Reagenzien und Tris · HCl gehemmt wird.

Der Zusatz von Isomaltose, Isomaltotriose, sowie α- und ß-Schardinger-Dextrin (10 m M) zum Inkubationsansatz führte zu einer schwachen Hemmung des D-Enzyms (10 % Hemmung).

Tab. 6.: Einfluss von Metallionen und verschiedenen Reagenzien auf die Aktivität des D-Enzyms

Zusatz	Konzentration (Mol)	Verbleibende Aktivität (%)
K e i n	---	100 %
$CaCl_2 \cdot 4H_2O$	10^{-3}	100 %
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10^{-3}	100 %
$Mn(III)Cl_2 \cdot 4H_2O$	10^{-3}	100 %
$FeCl_2 \cdot 6H_2O$	10^{-3}	60 %
$HgCl_2$	10^{-3}	20 %
EDTA $\cdot Na_2$	10^{-3}	90 %
pCMB	10^{-3}	70 %
DTT	$2,5 \cdot 10^{-3}$	90 %
2-Mercaptoäthanol	$2,5 \cdot 10^{-3}$	90 %
Tris · HCl	$5 \cdot 10^{-2}$	65 %

Reaktionsbedingungen: Nach Preinkubation des D-Enzyms mit dem jeweiligen Zusatz (15 Min., 30°C, 0,1 M Triäthanolamin, pH 7,6) wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 m Mol Maltose gestartet. Die freigesetzte Glucose wurde mit dem Hexokinase-Test ermittelt.

3.16. Die Verwertung von Stärke durch Pseudomonas stutzeri

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist es möglich, für den Stärke-Metabolismus bei Pseudomonas stutzeri das in Abbildung 46 dargestellte Stoffwechselschema aufzustellen.

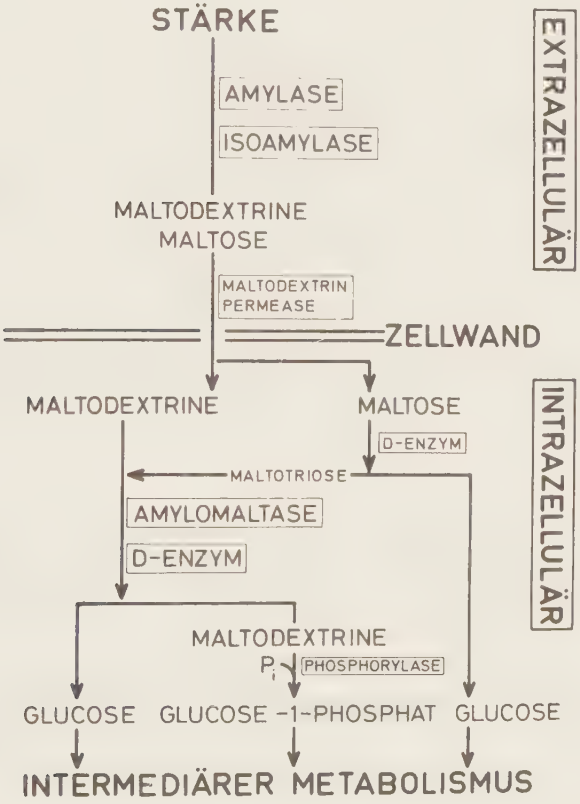

Abb.46.: Schema für die Verwertung von Stärke durch Ps.stutzeri.

Durch die extrazelluläre Amylase wird aus Stärke Maltotetraose freigesetzt, die dann durch dieses Enzym weiter zu Maltotriose, Maltose und Glucose hydrolysiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Amylase aus Ps.stutzeri auch in der Lage ist, Bindungen im Inneren des Substratmoleküls zu spalten, so dass die Stärke weiter abgebaut werden kann, als dieses durch einen reinen Exomechanismus möglich ist.

Neben der Amylase wurde im Kulturmedium von Ps.stutzeri eine Isoamylase nachgewiesen, die in verzweigten α-1,4-Glucanen die Verzweigungsstellen spalten und auf diese Weise eine bessere Substratausnutzung durch die Maltotetraose-bildende Amylase bewirken kann. Die Isoamylase ist im Gegensatz zur Pullulanase in der Lage, Glycogen vollständig in die entsprechenden Seitenketten zu zerlegen [127], was für einen spezifischen Nachweis der Isoamylase bei Ps.stutzeri ausgenutzt wurde [16]. Eine Pullulanase, wie sie kürzlich von WÖBER [23] bei Ps.stutzeri gefunden wurde, konnte im Kulturmedium dieses Bakteriums nicht nachgewiesen werden.

Das Vorkommen von Enzymen, welche α-1,6-glykosidische Bindungen spalten, wurde auch bei anderen Pseudomonas-Arten gefunden [128,129]. So scheidet Pseudomonas amyloderamosa eine Isoamylase aus [4,5,128], während Ps.saccharophila neben einer Pullulanase auch eine α-Amylase freisetzt (91,92,128).

Mit Hilfe einer Maltodextrin-Permease [23] werden die durch die Amylasen freigesetzten Maltodextrine in die Zelle transportiert. Durch die Wirkung der intrazellulären Amylomaltase und des D-Enzyms werden aus den beiden Maltodextrinen Maltotetraose und Maltotriose Glucose und höhere Maltodextrine gebildet.
Während die freigesetzte Glucose direkt in den intermediären Metabolismus eintreten kann, werden die synthetisierten höheren Maltodextrine durch eine Phosphorylase in Glucose-1-phosphat umgesetzt. Da die Amylomaltase zur Maltose eine äusserst geringe Affinität aufweist, wird dieses Disaccharid durch das D-Enzym in Glucose und Maltotriose umgesetzt.

Ein ähnliches Maltodextrin-verwertendes System wurde bislang bei Aerobacter aerogenes, Streptococcus mutans und Escherichia coli ML 47, sowie bei Pseudomonas amyloderamosa und Pseudomonas saccharophila 128 gefunden. In keinem Fall wurde aber die gleichzeitige Anwesenheit von Amylomaltase und dem D-Enzym beschrieben.

4. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurden drei Enzyme, die für die Verwertung von Stärke durch Pseudomonas stutzeri nötig sind, gereinigt und charakterisiert.

2. Die extrazelluläre Maltotetraose-bildende Amylase aus Ps. stutzeri wurde 246-fach durch Affinitätschromatographie mit Sephadex G-100 als Adsorbens und durch Hydroxylapatit-Chromatographie gereinigt.

3. Durch die HA-Chromatographie wurden zwei amylolytisch aktive Fraktionen erhalten. Mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass die Hauptfraktion aus zwei Polypeptidketten besteht, deren Molekulargewichte 48.000 bzw. 58.000 Daltons betragen. Die kleinere Fraktion enthielt nur eine Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 48.000 Daltons. Diese Werte stimmten gut mit dem Ergebnis aus der Molekulargewichtsbestimmung der reduzierten Amylase in Gegenwart von 6 M Gu · HCl überein.

4. Nach Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden sieben Isoenzyme identifiziert. Alle sieben Banden zeigten Amylase-Aktivität, wie durch ein Zymogramm mit einem Amylose-Polyacrylamidgel nachgewiesen wurde.

5. Die Quervernetzung der Amylase mit Dimethylsuberimidat und anschliessender SDS-PAGE ergab zwei Protomere und eine gut sichtbare Bande mit einem Molekulargewicht von 120.000 Daltons, welche andeutet, dass das native Enzym aus Dimeren besteht.

6. Beim Abbau von Stärke durch die Amylase entsteht zunächst ausschliesslich Maltotetraose als Produkt, die dann langsam weiter zu Maltotriose, Maltose und Glucose abgebaut werden kann.

7. Die Spaltung von endogenen Maltotetraose-Einheiten im Pullulanmolekül und die Hydrolyse von quervernetzter blaugefärbter Stärke durch die Amylase deuten auf einen Endomechanismus des Substratabbaus hin.

8. Die Amylase wird kompetitiv durch Dextran, Pullulan und Maltotetraose gehemmt und kann durch Cycloheptamylose aktiviert werden.
   Das Enzym benötigt für seine Aktivität Ca^{2+} und wird durch Schwermetallionen

vollständig gehemmt.

9. Die aus Stärke freigesetzten Maltodextrine und Maltose werden durch die induzierbaren Transferasen Amylomaltase und D-Enzym in den intermediären Stoffwechsel eingeschleust.
Aus dem Zellextrakt von Pseudomonas stutzeri wurde durch Ammoniumsulfatfällung, Gelchromatographie, Ionenaustausch- und Hydroxylapatit-Chromatographie das D-Enzym von der Amylomaltase getrennt. Das D-Enzym wurde 100-fach gereinigt, während die Amylomaltase 250-fach angereichert wurde.

10. Die Molekulargewichtsbestimmung an Sephadex G-200 ergab einen Wert von 74.000 Daltons für die Amylomaltase und 115.000 Daltons für das D-Enzym. Durch SDS-PAGE wurde für jedes Enzym zwei Untereinheiten mit unterschiedlichen Molekulargewichten ermittelt.

11. Das pH-Optimum beider Transferasen liegt bei pH 7,6.
Während die Amylomaltase noch bei 50 °C nennenswerte Aktivität aufweist, wird das D-Enzym, dessen Temperatur-Optimum bei 30 °C liegt, durch höhere Temperaturen wesentlich stärker geschwächt.

12. Die Inkubation der Amylomaltase aus Ps.stutzeri mit Maltotetraose lieferte das gleiche Muster von Maltodextrinen, wie sie aus G4 durch die Wirkung von Amylomaltase aus E.coli ML synthetisiert wurden.
Im Gegensatz zur Amylomaltase aus E.coli ML bildete das Enzym aus Ps.stutzeri keine höheren Dextrine, die mit Jod eine Farbreaktion ergaben. Darüber hinaus war der Maltosepeak im Wirkungsmuster der Amylomaltase aus Ps.stutzeri deutlich kleiner als beim E.coli Enzym.

13. Durch die Übertragung von Maltotriosyl-Einheiten bildet das D-Enzym mit Maltotetraose als Substrat G1 , G7 , G10 , G13 , G16 und G19 als Hauptprodukte.
Die mit dem D-Enzym aus Ps.stutzeri synthetisierten Oligosaccharide hatten nicht die entsprechende Kettenlänge, um mit Jod eine Färbung zu ergeben.

14. Beide Transferasen synthetisieren ausschliesslich α-1,4 verknüpfte Polyglucosen, wie durch Abbau der Reaktionsprodukte mit β-Amylase und anschliessender

chromatographischer Bestimmung der Abbauprodukte ermittelt werden konnte.

15. Kinetische Messungen ergaben, daß die Amylomaltase Maltotetraose wesentlich besser verwerten kann als Maltotriose oder Maltose, wobei chromatographisch reine Maltose kaum als Substrat für dieses Enzym angesehen werden kann. Der K_m - Wert für die Amylomaltase mit Maltotetraose als Substrat beträgt $7,1 \times 10^{-3}$ M. Anders als die Amylomaltase, setzt das D-Enzym aus Maltose die grösste Glucosemenge frei, während mit zunehmender Kettenlänge (G3, G4) die freigesetzte Glucosekonzentration abnimmt. Der K_m - Wert für das D-Enzym mit Maltose als Substrat beträgt $8,3 \times 10^{-3}$ M.

16. Beide Glycosyltransferasen werden durch Schwermetallionen gehemmt. Darüber hinaus kann das D-Enzym durch Tris·HCl teilweise inaktiviert werden.

17. Die Bedeutung der Amylase, Amylomaltase und D-Enzym für den Stärke-Stoffwechsel bei Pseudomonas stutzeri wird diskutiert.

5. LITERATUR

1) M. Doudoroff (1940) : The oxidative assimilation of sugars and related substances by Pseudomonas saccharophila. The problem of the direct respiration of di- and polysaccharides. Enzymologia 9, 59 - 72.

2) R. Y. Stanier, N. J. Palleroni und M. Doudoroff (1966) : The aerobic Pseudomonas : a taxonomic study. J. gen. Microbiol. 43, 159 - 271.

3) N. J. Palleroni, M. Doudoroff and R. Y. Stanier (1970) : Taxonomy of the aerobic Pseudomonas : The Properties of the Pseudomonas stutzeri group. J. gen. Microbiol. 60, 215 - 231.

4) T. Harada, K. Yokobayashi und A. Misaki (1968) : Formation of isoamylase by Pseudomonas. Appl. Microbiol. 16, 1439 - 1444.

5) K. Yokobayashi, A. Misaki und T. Harada (1970) : Purification and properties of Pseudomonas isoamylase. Biochem. Biophys. Acta 212, 458 - 469.

6) J. F. Robyt und R. J. Ackerman (1971) : Isolation, purification and characterization of a maltotetraose-producing amylase from Pseudomonas stutzeri . Arch. Biochem. Biophys. 145, 105 - 114.

7) J. F. Robyt und R. J. Ackerman (1972) : Amylase from Pseudomonas stutzeri . Methods of Enzymology, Vol. XXVIII, ed. V. Ginsburg, Academic Press (New York) S. 925 - 930.

8) J. A. Thoma, H. B. Wright und D. French (1959) : Partition chromatography of homologous saccharideson cellulose columns. Arch. Biochem. Biophys. 85, 452 - 460.

9) D. French, J. F. Robyt, M. Weintraub und P. Knoch (1966) : Separation of Maltodextrins by charcoal chromatography. J. Chromatog. 24, 68 - 75.

10) CPC International Inc. (1972) : Production of High Maltotetraose Syrup. U.S. Patent Nr. 3654082 .

11) H. Bender und K. Wallenfels (1966) : Pullulanase (an amylopectin and glycogen debranching enzyme) from Aerobacter aerogenes . Methods of Enzymology, Vol. VIII, ed. E. F. Neufeld und V. Ginsburg, Academic Press (New York und London) S. 555 - 559.

12) M. John, E. Flindt, J. Schmidt und H. Dellweg (1977) : Die Bestimmung von Alpha- und Beta-Amylasen in Gerstenmalz - eine neue Analysenmethode. Mschr. Brauerei 30, 114 - 120.

13) M. John et al., in Vorbereitung.

14) N. Saito (1973) : A thermophilic extracellular α-amylase from Bacillus licheniformis . Arch. Biochem. Biophys. 155 , 290 - 298.

15) K. Kainuma, S. Kobayashi, T. Ho und S. Suzuki (1972) : Isolation and action pattern of maltohexaose-producing amylase from Aerobacter aerogenes. FEBS Letters 26, 281 - 285.

16) J. Schmidt (1973) : Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Amylasen aus Pseudomonas stutzeri. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin.

17) H. Dellweg, M. John und J. Schmidt (1975) : Amylases from Ps. stutzeri . Affinity chromatography of exo-malto-tetraohydrolase using Sephadex G - 100 as an adsorbent. European J. Appl. Microbiol. 1, 191 - 198.

18) M. Ceska, E. Hultman und D. G. A. Ingelman (1969) : A new method for the determination of α-amylase. Experientia 25, 555 - 556.

19) J. J. Marshall (1970) : Action of Amylolytic Enzymes on a Chromogenic Substrate. Anal. Biochem. 37, 466 - 470.

20) W. C. Barnes und A. B. Blakeney (1974) : Determination of cereal α-amylase using a commercially available dye-labelled substrate. Die Stärke 26, 193 - 197.

21) H. Dellweg und M. John (1972) : Über die Wirkungsweise stärkeabbauender Enzyme. Mschr. Brauerei 25, 271 - 278.

22) D. J. Manners (1962) : Enzymic Synthesis and degradation of starch and glycogen. Advances in Carbohydrate Chemistry, Vol. 17, Academic Press (New York und London) S. 371 - 430.

23) G. Wöber (1973) : The Pathway of maltodextrin metabolism in Pseudomonas stutzeri. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 354, 75 - 78.

24) J. Monod und A. M. Torriani (1948) : Compt. Rend. Acad. Sci. 227, 240.

25) J. Monod und A. M. Torriani 1950) : De l'amylomaltase d'escherichia coli. Ann. Inst. Pasteur 78, 65.

26) H. Wiesmeyer und M. Cohn (1960) : The characterization of the pathway of maltose utilization by Escherichia coli. III. A description of the concentrating mechanism. Biochim. Biophys. Acta 39, 440 - 447.

27) T. N. Palmer, G. Wöber und W. J. Whelan (1973) : The pathway of exogenous and endogenous carbohydrate utilization in Escherichia coli: A dual function for the enzymes of the maltose operon. Eur. J. Biochem. 39, 601 - 612.

28) H. Wiesmeyer und M. Cohn (1960) : The characterization of the pathway of maltose utilization by Escherichia coli. II. General properties and mechanism of action of Amylomaltase. Biochim. Biophys. Acta 39, 427 - 439.

29) T. N. Palmer und B.E. Ryman (1968) : The action pattern of amylomaltase. FEBS Letters 1, 1 - 3.

30) T. N. Palmer und B. E. Ryman und W. J. Whelan (1976) : The action pattern of amylomaltase from Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 69, 105 - 115.

31) H. Wiesmeyer und M. Cohn (1960) : The characterization of the pathway of maltose utilization of Escherichia coli. I. Purification and physical chemical properties of the enzyme amylomaltase. Biochem. Biophys. Acta 39, 417 - 426.

32) G. J. Walker und W. J. Whelan (1959) : Synthesis of amylose by potato D-Enzyme. Nature 183, 46.

33) S. Peat, W. J. Whelan und W. R. Rees (1953) : D-Enzyme : a disproportionating enzyme in potato juice. Nature 172, 158.

34) S. Peat, W. J. Whelan und W. R. Rees (1956) : The enzyme synthesis and degradation of Starch. Part XX. The disproportionating enzyme (D-enzyme) of the potato. J. Chem. Soc. (1956) I, 44 - 53.

35) D. J. Manners und K. L. Rowe (1969) : Studies on carbohydrate and D-enzyme activity of extracts of carrots and tomatoes. Carbohyd. Res. 9, 441 - 450.

36) G. J. Walker (1965) : A transglycosylase of Streptococcus bovis. Biochem. J. 94, 299 - 308.

37) G. J. Walker (1966) : Metabolism of the reserve polysaccharide of Streptococcus mitis. Properties of a transglycosylase. Biochem. J. 101, 861 - 872.

38) D. H. Brown und B. Illingworth (1962) : The properties of an oligo-1,4 $\longrightarrow$1,4- glucantransferase from animal tissues. Proc. Natl. Acad. Sci.: U. S. 48, 1783 - 1787.

39) W. J. Whelan (1964) : Hydrolysis with ß-amylase and preparation of the ß-amylase limit dextrin of amylopectin. Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 4, ed. R. L. Whistler, Academic Press (New York) S. 261 - 266.

40) H. Bender und K. Wallenfels (1961) : Untersuchungen an Pullulan : II. Spezifischer Abbau durch ein bakterielles Enzym. Biochem.Z. 334, 79.

41) G. S. Drummond, E. E. Smith, W. J. Whelan und H. Tai (1969): Mechanism of action of pullulanase. FEBS Letters 5, 85 - 88.

42) B. J. Catley und W. J. Whelan (1971): Observations on the structure of pullulan. Arch. Biochem. Biophys. 143, 138 - 142.

43) M. John (1972): Über die chromatographische Untersuchung der Kohlenhydrate in Würze und Bier. Dissertation, Technische Universität Berlin.

44) A. A. Green und W. L. Hughes (1955): Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. Methods of Enzymology, Vol. I, ed. S. P. Elowick and N. O. Kaplan, Academic Press (New York) S. 67 - 90.

45) P. Flodin (1961): Methodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations. J. Chromatog. 5, 103 - 115.

46) M. Ceska, K. Birath und B. Brown (1969): A new and rapid method for the clinical determination of α-amylase activities in human serum and urine optimal conditions. Clin. Chim. Acta 26, 437 - 444.

47) M. Ceska, B. Brown und K. Birath (1969): Ranges of α-amylase activities in human serum and urine and correlations with other α-amylase methods. Clin. Chim. Acta 26, 445 - 453.

48) D. J. Graves und J. H. Wang (1972): α-glucan phosphorylases chemical and physical basis of catalysis and regulation. The Enzymes, Vol. III, ed. P. D. Boyer, Academic Press (New York und London) p. 435 - 482.

49) A. Munch-Petersen und H. M. Kalckar (1955): UDPG-Pyrophosphorylase from Yeast. Methods in Enzymology, Vol. II, ed. S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press (New York) S. 675 - 677.

50) H. U. Bergmeyer und G. Michal (1974): D-Glucose-1-Phosphat. Methoden der enzymatischen Analyse, ed. H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie (Weinheim), S. 1279 - 1287.

51) Boehringer Mannheim GmbH (1974): Glucose-Bestimmung. Hexokinase-Methode. Arbeitsanleitungen (Mikrolitermethoden) 2/74, Boehringer Diagnostica.

52) A. G. Gornall, C. A. Bardawill und M. M. David (1949): Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol Chem. 177, 751 - 766.

53) Boehringer Mannheim GmbH (1973): Gesamt-Eiweiss. Test-Fibel 1973.

54) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.

55) G. R. Schacterle und R. L. Pollack (1973): A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. Anal. Biochem. 51, 654 - 655.

56) J. B. Sumner und V. A. Graham (1971): Dinitrosalicylic acid: A reagent for the Estimation of sugar in normal und diabetic urine. J. Biol. Chem. 47, 5 - 9.

57) J. F. Robyt und W. J. Whelan (1972): Reducing value methods for maltodextrins: chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper. Anal. Biochem. 45, 510 - 516.

58) W. Rick und H. P. Stegbauer (1970): Alpha-Amylase, Messung der reduzierenden Gruppen. Methoden der enzymatischen Analyse, ed. H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie (Weinheim) S. 848 - 853.

59) M. John, G. Trénel und H. Dellweg (1969): Quantitative chromatography of homologous glucose oligomers and other saccharides using polyacrylamide gel. J. Chromatog. 42, 476 - 484.

60) M. John und H. Dellweg (1973): Gel chromatographic separation of oligosaccharides. Separation and Purification Methods, ed. E. S. Perry und C. J. van Oss, Marcel Dekker, Inc. (New York) 2 (2), 231 - 257.

61) R. B. Kesler (1967): Rapid quantitative ion-exchange chromatography of carbohydrates. Anal. Chem. 39, 1416 - 1422.

62) J. Tillmans und K. Phillipi (1929): Über den Gehalt der wichtigsten Proteine der Nahrungsmittel an Kohlenhydraten und über ein kalorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von stickstofffreiem Zucker in Eiweiss. Biochem. Z. 251, 36.

63) M. Sörensen und G. Haugaard (1933): Über die Anwendbarkeit der Orcinreaktion zur Bestimmung der Art und Menge von Kohlenhydrat-Gruppen in Eiweiss-Stoffen. Biochem. Z. 260, 147.

64) H. Dellweg, M. John und B. Förster (1975): Characterization of an extracellular polysaccharide from Pseudomonas stutzeri. European J. Appl. Microbiol. 1, 307 - 312.

65) G. Bernardi (1973): Chromatography of proteins on hydroxylapatite. Methods in Enzymology, Vol. XXVII, ed. C. W. Hirs und S. N. Timasheff, Academic Press (New York und London) S. 471 - 179.

66) Bio-Rad Laboratories (1975): Materials, equipment and systems for: chromatography, electrophoresis and membrane technology. Catalogue A 1975 - 1976, S. 63 - 68.

67) G. Bernardi (1971): Chromatography of proteins on hydroxylapatite. Methods in Enzymology, Vol. XXII, ed. W. B. Jakoby, Academic Press (New York und London) S. 325 - 339.

68) L. Ornstein (1964): Disc electrophoresis - I : Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 - 349.

69) B. J. Davis (1964): Disc-electrophoresis - II: Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 401 - 427.

70) O. Gabriel (1971): Analytical disc electrophoresis. Methods in Enzymology, Vol. XXII, ed. W. B. Jakoby, Academic Press (New York und London) S. 565 - 578.

71) H. R. Maurer (1968): Diskelektrophorese. Walter de Gruyter & Co. (Berlin) S. 71.

72) A. H. Wardi und G. A. Michos (1972): Alcian blue staining of glycoproteins in acrylamide disc electrophoresis. Anal. Biochem. 49, 607 - 609.

73) H. Heller und R. G. Kulka (1968): Amylase isoenzymes in the developing chicken pancreas. B iochem. Biophys. Acta 165, 393 - 397.

74) A. L. Shapiro, E. Vinuela und J. V. Maizel (1967): Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815 - 820.

75) K. Weber und M. Osborn (1969): The realibility of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412.

76) U. K. Laemmli (1970): Cleavage of structured proteins during assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 227, 680 - 685.

77) F. H. Carpenter und K. T. Harrington (1972): Intermolecular cross-linking of monomeric proteins and cross-linking of oligomeric proteins as a probe of quaternary structure. J. Biol. Chem. 247, 5580 - 5586.

78) G. E. Davies und G. A. Stark (1970): Use of dimethylsuberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 651 - 656.

79) K. G. Mann und W. W. Fish (1972): Polypeptide chain molecular weights by gel chromatography in guanidinium chloride. Methods in Enzymology, Vol. XXVI, ed. W.W.Hirs und S.N.Timasheff, Academic Press (New York und London) S. 28 - 42.

80) H. Linewaver und D. Burk (1934): The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 - 666.

81) M. Dixon (1953): The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. 55, 170 - 171.

82) M. Dixon und E. C. Webb (1964): Enzymes. 2nd edition, Longmans (London).

83) Pharmacia (1971): Beaded Sepharose ® 2b - 4B - 6B covering the whole field of agarose gel Filtration. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.

84) Pharmacia (1975): Sephadex ® ion exchangers. A guide to ion exchange chromatography. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.

85) A. A. Leach und P. C. O'Shea (1965): The determination of protein molecular weights of up to 225.000 by gelfiltration on a single column of Sephadex G - 200 at 25° and 40°. J. Chromatog. 17, 245 - 251.

86) P. Andrews (1970): Estimation of molecular sizes and molecular weights of biological compounds by gel filtration methods of biochemical analysis, Vol. 18, ed. David Glick, Interscience Publishers (New York - London - Sidney - Toronto) S. 1 - 53.

87) M. John und H. Dellweg (1973): Quantitative gaschromatographische Bestimmung der Mono- und Oligosaccharide in Würze und Gerstenmalz. Mschr. Brauerei 26, 145 - 152.

88) S. Hjertén (1970): Thermodynamic treatment of partition experiments with special reference to molecular-sieve chromatography. J. Chromatog. 50, 189 - 208.

89) H. Dellweg, M. John und G. Trénel (1971): Gel permeation chromatography of maltooligosaccharides at different temperatures. J. Chromatog. 57, 87 - 97.

90) M. Nomura, B. Marno und S. Matori (1956): Studies on amylase formation by Bacillus subtilis. 1. Effect of high concentration of polyethylene glycol on amylase formation by Bacillus subtilis. J. Biochem. 43, 143 - 152.

91) A. Markowitz und H. P. Klein (1955): Some aspects of the induced biosynthesis of alpha-amylases of Pseudomonas saccharophila. J. Bacteriol. 70, 641 - 648.

92) A. Markowitz und H. P. Klein (1955): On the sources of carbon for the induced biosynthesis of alpha-amylase in Pseudomonas saccharophila. J. Bacteriol. 70, 649 - 655.

93) N. E. Welker und L. L. Campbell (1963): Induction of carbon sources on formation of a α-amylase by Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol. 86, 681 - 686.

94) N. E. Welker und L. L. Campbell (1963): Induction of α-amylase of Bacillus stearothermophilus by maltodextrins. J. Bacteriol. 86, 687 - 691.

95) V. Buonocore, C. Caporale, H. de Rose und A. Gambacorta (1976): Stable, inducible, thermoacidophilic α-amylase from Bacillus acidocaldarius. J. Bacteriol 128, 519 - 521.

96) J. A. Thoma und D. E. Koshland (1960): Competitive inhibition by substrate during enzyme action. Evidence for the induced-fit theory. J. Amer. Chem. Soc. 82, 3329 - 3333.

97) J. A. Thoma, D. E. Koshland, J.Ruscica, R. Baldwin (1963): The number of binding sites of sweet potato beta-amylase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 184 - 188.

98) J. J. Marshall (1972): On the interaction of ß-amylase with substrate and inhibitors, with comments on Koshland's induced - fit hypothesis. Eur. J. Biochem. 33, 494 - 499.

99) S. K. Dube und P. Nordin (1961): Isolation and properties of sorghum α-amylase. Arch. Biochem. Biophys. 94, 121 - 127.

100) A. Loyter und R. Schramm (1962): The glycogen-amylase complex as a means of obtaining highly purified α-amylases. Biochim. Biophys. Acta 65, 200 - 206.

101) R. Tkachuck (1975): Competitive affinity chromatography of wheat α-amylase. FEBS letters 52, 66 - 68.

102) P. Vretblad (1974): Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. The cyclohexamylose - ß - amylase system. FEBS letters 47, 86 - 89.

103) A. Wadano und Y. Morita (1972): Studies on amylases of Aspergillus oryzae cultured on rice, part V : Molecular dimension and chemical composition of α-amylase. Chem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ. 33, 1 - 7.

104) B. Gelotte (1964): Separation of pancreatic enzymes by gel filtration. Acta Chem. Scand. 18, 1283 - 1291.

105) W. Witt (1975): Charakterisierung der Amylasen aus Pseudomonas stutzeri. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin.

106) J. F. Robyt, C. G. Chittenden und C. T. Lee (1971): Structure and function of amylases. I The subunit structure of porcine pancreatic α-amylase. Arch. Biochem. Biophys. 144, 160 - 167.

107) J. F. Robyt und R. J. Ackerman (1973): Structure and function of amylases. II. Multiple form of Bacillus subtilis α-Amylase. Arch. Biochem. Biophys. 155, 445 - 451.

108) E. D. Mitchell, P. Riquetti, H. Loring und K. L. Carraway (1973): Quaternary structure of Bacillus subtilis α-amylase. Anomalous behaviour in sodium dodecyl sulfate. Biochem. Biophys. Acta 295, 314 - 322.

109) W. Thorun (1971): Der Molekularsiebeffekt bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese als Funktion von Molekülgrösse, Gelkonzentration und Gelvernetzung sowie seine Anwendung zur Molekulargewichtsbestimmung. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 9, 3 - 12.

110) W. Fish, K. G. Mann und C. Tanford (1969): The estimation of polypeptide chain molecular weights by gel filtration in 6 M guanidine hydrochloride. J. Biol. Chem. 244, 4989 - 4994.

111) P. Bernfeld (1951): Enzymes of starch degradation and synthesis. Adv. Enzymol. 12, 379 - 428.

112) B. J. Catley, J. E. Robyt und W. J. Whelan (1966): A minor structural feature of pullulan. Biochem. J. 100, 5 P - 6 P.

113) B. J. Catley (1970): Pullulan, a relationship between molecular weight and fine structure. FEBS letters 10, 190 - 193.

114) M. Abdullah, B. J. Catley, E. Y. C. Lee, J. F. Robyt, K. Wallenfels und M. J. Whelan (1966): The mechanism of carbohydrase action. 11. Pullulanase, an enzyme specific for the hydrolysis of alpha-1,6-bonds in amylaceous oligo- and polysaccharides. Cereal Chem. 43, 111 - 118.

115) K. Kainuma und D. French (1969): Action of pancreatic amylase on starch-oligosaccharides containing single glucose-side chains. FEBS Letters 5, 257 - 261.

116) J. F. Robyt und W. J. Whelan (1968): Starch and its derivates, ed. J. A. Radley, Chapmen & Hall (London) Chap. 14.

117) J. J. Marshall (1973): Inhibition of pullulanase by Schardinger dextrins. FEBS Letters 37, 269 - 273.

118) E. H. Fischer und E. A. Stein (1960): α-amylases. The Enzymes, Vol. IV, ed. P. D. Boyer, Academic Press (New York und London) S. 313 - 343.

119) E. A. Stein, J. Hsiu und E. H. Fischer (1964): Alpha-amylases as calcium-metalloenzymes. 1. Preparation of calcium-free apoamylases by and electrodialysis. Biochemistry 3, 56 - 61.

120) C. T. Greenwood und E. A. Milne (1968): Starch degrading and synthesizing enzymes. Advances in carbohydrate chemistry, Vol. 23, Academic Press (New York und London) S. 281 - 366.

121) W. W. Cleland (1964): Dithiothritol, a new protective reagent for SH-groups. Biochemistry 3, 480 - 482.

122) H. Determann (1967): Gelchromatographie. Springer Verlag, Berlin.

123) V. Häselbarth, G. V. Schulz und H. Schwinn (1971): Untersuchungen über Amylomaltase: II. Molekulare Konstanten und Wirkungsweise des Enzyms. Biochem. Biophys. Acta 227, 296 - 312.

124) H. Doudoroff, W. Z. Hassid, E. W. Putman, A. L. Potter und J. Lederberg (1949): Direct utilization of maltose by Escherichia coli. J. Biol. Chem. 179, 921 - 934.

125) S. A. Barker und E. J. Bourne (1952): The oligosachcarides synthesized from maltose by Escherichia coli. J. Chem. Soc. (1952), 209 - 215.

126) L.Glaser (1964): Glycosyl transfer reaction. Comprehensive Biochemistry, Vol.15, ed. M.Florkin und E.H.Stotz, Elsevier Publishing Company (Amsterdam, London, New York) Chapter IV, S.93 - 137.

127) E.Y.C. Lee und W.J.Whelan (1971): Glycogen and starch debranching enzymes. The Enzymes, Vol.V, ed.P.D.Boyer, Academic Press (New York and London) S. 191 - 234.

128) J.Norrman und G.Wöber (1975): Comparative biochemistry of α-glucan-utilization in Pseudomonas amyloderamosa and Pseudomonas saccharophila. Arch.Microbiol. 102, 253 - 260.

129) T.N.Palmer und G.Wöber (1975): The metabolic role of debranching enzymes. Biochem.Soc. Trans. 3, 53 - 56.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Lehrstuhl für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin durchgeführt.
Ich danke Michael John, ehemaliger wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Biotechnologie, für seine vielseitige Unterstützung und anregenden Diskussionen während der Durchführung der Arbeit.

LEBENSLAUF

19.07.1948	Geboren in Lübeck-Travemünde als Sohn des Braumeisters Fritz Schmidt und dessen Ehefrau Irmgard, geb. Gaygk
1955	Einschulung in Hamburg
31.03.1968	Schulabschluß mit dem Reifezeugnis am Gymnasium für Jungen in Hamburg-Blankenese
1968 - 1969	Bundeswehr
1969/70	Industriepraktikum in der Holsten-Brauerei, Hamburg; Bill-Brauerei, Hamburg; Malzfabrik Schöneberg der Schultheiss AG Berlin; Bavaria - und St. Pauli Brauerei, Hamburg - Harburg
WS 1969/70	Eingeschrieben als Student der Brauereitechnologie an der Technischen Universität Berlin
16.04.1974	Studiumabschluß mit dem Diplom-Ingenieur für Brauerei-technologie
seit April 1974	Durchführung eines Forschungsvorhabens im Institut für Gärungs-gewerbe und Biotechnologie Berlin über Amylasen in Gerste. Beginn einer Dissertation über den Stärke-Metabolismus bei Pseudomonas stutzeri